



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PISA

Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali

Corso di Laurea Magistrale in

Biotecnologie Molecolari e Industriali

Tesi di Laurea Magistrale

Espressione e purificazione di CLAN

Candidato

Yuri Ceragioli

Relatore

Prof. Maria Grazia Tozzi

Correlatori

Prof. Antonella Del Corso

Prof. Massimo Dal Monte

ANNO ACCADEMICO 2012-2013

Riassunto

Le proteine CLAN, note anche come CARD12, IPAF o NLRC4, sono un ristretto gruppo di proteine citosoliche scoperte nei primi anni 2000 (Damiano J.S., et al., 2001). Esistono 4 varianti di splicing di CLAN generate dallo stesso locus genomico di 41,3 Kbs sul cromosoma 2. Le quattro isoforme (CLAN-A, B, C, D) si differenziano per dimensioni e profilo di espressione. Le due forme più comuni sono CLAN-A e CLAN-B. L'isoforma A è quella a più alto PM ed è costituita da tre domini: un dominio di interazione CARD al terminale amminico, un dominio Leucine Rich Repeat (LRR) al terminale carbossilico e un voluminoso dominio NACHT in posizione centrale. CLAN-A è espressa nel tessuto polmonare, nella prostata, nel cervello, nel fegato e nei leucociti ad eccezione dei linfociti. L'isoforma B si differenzia dalla prima per l'assenza del dominio NACHT ed è espressa a vari livelli in tutti i tessuti. Dal punto di vista funzionale CLAN fa parte dell'inflammasoma un complesso proteico che media l'attivazione della Caspasi 1, con la quale CLAN interagisce direttamente. La Caspasi 1 attivata media a sua volta il rilascio di Il-18, Il-1 β e l'attivazione della Caspasi 7 giocando così un ruolo nei processi infiammatori e di morte cellulare. Molto però deve essere ancora scoperto su CLAN, in particolare sull'isoforma B, i cui dati in letteratura scarseggiano. Recentemente uno studio esplorativo di doppio ibrido in lievito condotto da Tozzi e collaboratori (2013, dati in fase di pubblicazione) ha individuato una sequenza riconducibile a CLAN-A e CLAN-B come possibile partner di interazioni con la 5' nucleotidasi citosolica II (cN-II). La cN-II è un enzima citosolico appartenente alla superfamiglia HAD,

estremamente conservato nell'evoluzione, ubiquitariamente espresso, in grado di catalizzare sia l'idrolisi di GMP e IMP sia il trasferimento del gruppo fosfato da un nucleotide donatore a un nucleoside accettore come la guanosina o l'inosina. Gioca un ruolo fondamentale nel metabolismo cellulare dove regola i livelli intracellulari di IMP e GMP, oltre a partecipare ad altri pathways metabolici come il ciclo delle ossipurine. La sua importanza è confermata dal fatto che il suo silenziamento in cellule di astrocitoma induce apoptosi. La cN-II inoltre è in grado di agire su analoghi purinici usati come profarmaci antivirali e antitumorali ed è coinvolta nella sindrome di Lesch-Nyan. Tutto questo ha posto la cN-II al centro dell'attenzione di diversi gruppi di ricerca e oggi si sa molto sulla sua struttura proteica e su quella del sito attivo, sulla regolazione e sul meccanismo di catalisi, mentre poco è stato fatto per esplorare le possibili interazioni che l'enzima può avere con altre proteine e componenti cellulari. Tenendo conto di queste premesse scopo di questa tesi è stata l'espressione eterologa di CLAN e la sua purificazione, con la duplice finalità di migliorare tanto le conoscenze su CLAN che quelle sulle interazioni della cN-II. Per farlo, cellule di *Escherichia Coli* ceppo *Rosetta* sono state trasformate con un plasmide codificante per CLAN-B, a sua volta ottenuto per modifica di un plasmide codificante per CLAN-A. Nei batteri è stata indotta l'espressione della proteina di interesse; sono state poi testati diversi protocolli di purificazione, operanti sia in condizioni denaturanti che in condizioni native, per individuare quello più adatto alla purificazione di CLAN-B. Per completezza sono stati condotti studi anche sull'espressione eterologa di CLAN-A.

INDICE

1. Introduzione

<i>1.1 La 5' Nucleotidasi Citosolica (cN-II): Generalità</i>	<i>Pag. 6</i>
<i>1.2 La 5' Nucleotidasi Citosolica (cN-II) e la Superfamiglia HAD</i>	<i>Pag. 7</i>
<i>1.3 La 5' Nucleotidasi Citosolica (cN-II): la struttura</i>	<i>Pag. 12</i>
<i>1.4 La 5' Nucleotidasi Citosolica (cN-II): meccanismo d'azione</i>	<i>Pag. 16</i>
<i>1.5 La 5' Nucleotidasi Citosolica (cN-II): la regolazione</i>	<i>Pag. 18</i>
<i>1.6 La 5' Nucleotidasi Citosolica (cN-II): ruoli fisiologici</i>	<i>Pag. 21</i>
<i>1.7 La 5' Nucleotidasi Citosolica (cN-II): l'interesse clinico</i>	<i>Pag. 26</i>
<i>1.8 La 5' Nucleotidasi Citosolica e CLAN</i>	<i>Pag. 30</i>
<i>1.9 Oggetto dello studio</i>	<i>Pag. 39</i>

2. Materiali e Metodi

<i>2.1 Materiali</i>	<i>Pag. 40</i>
<i>2.2 Modifica del plasmide</i>	<i>Pag. 41</i>
<i>2.3 Elettroforesi in gel di Agarosio</i>	<i>Pag. 48</i>
<i>2.4 Preparazione cellule competenti</i>	<i>Pag. 48</i>
<i>2.5 Trasformazione Batterica</i>	<i>Pag. 49</i>
<i>2.6 Induzione dell'espressione di CLAN-B e preparazione dell'estratto grezzo</i>	<i>Pag. 50</i>
<i>2.7 Purificazione CLAN-B</i>	<i>Pag. 51</i>
<i>2.8 Stima della concentrazione proteica</i>	<i>Pag. 56</i>
<i>2.9 Elettroforesi SDS-PAGE</i>	<i>Pag. 56</i>
<i>2.9.1 Espressione CLAN-A</i>	<i>Pag. 56</i>

3. Risultati e discussione

3.1 Modifica del plasmide *Pag. 57*

3.2 Espressione CLAN-B *Pag. 61*

3.3 Purificazione CLAN-B *Pag. 62*

3.4 Espressione CLAN-A *Pag. 67*

4. Conclusioni e prospettive future *Pag. 69*

5. Ringraziamenti *Pag. 73*

6. Riferimenti *Pag. 74*

1 Introduzione

1.1 La 5' Nucleotidasi Citosolica (cN-II): Generalità

Le 5' nucleotidasi appartengono ad una famiglia di enzimi, a sua volta appartenente alla superfamiglia delle aloacido dealogenasi (HAD), presenti in tutti gli organismi viventi (batteri, piante, vertebrati e invertebrati). I membri della famiglia delle nucleotidasi si distinguono, all'interno della stessa specie, per localizzazione subcellulare, tissutale e per la specificità di substrato. Si tratta di enzimi coinvolti nel metabolismo dei nucleotidi purinici e pirimidinici, catalizzano la defosforilazione di ribo- e deossiribonucleosidi monofosfato e contribuiscono alla regolazione della loro concentrazione intracellulare. Nell'uomo sono state isolate e caratterizzate sette 5'nucleotidasi di cui una mitocondriale, una ancorata alla superficie esterna della membrana cellulare e cinque citosoliche. Tra queste ultime, la 5'nucleotidasi citosolica II (cN-II) ha una distribuzione ubiquitaria e i suoi substrati principali sono GMP, IMP e i loro deossiderivati. La cN-II è in grado di catalizzare sia l'idrolisi di GMP e IMP sia il trasferimento del gruppo fosfato da un nucleotide donatore a un nucleoside accettore come la guanosina o l'inosina; per questa caratteristica è stata spesso descritta come un enzima bifunzionale. Nell'uomo il gene per la cN-II si trova sul cromosoma 10 (Galmarini C.M., et al., 2001) e il suo mRNA è espresso in maniera ubiquitaria in tutti i tessuti. L'attività specifica della cN-II è diversa nei diversi tipi cellulari, infatti, ad esempio, risulta più alta nei fibroblasti e nei granulociti e più bassa nei globuli rossi. Alte attività si riscontrano anche nelle cellule del carcinoma del colon, in particolare se

confrontate con quelle riscontrabili nelle cellule del tessuto peri tumorale sano dello stesso paziente (Tozzi M.G., et al., 1991). Questi dati indicano come l'enzima sia maggiormente espresso in quei tessuti che mostrano un alto turnover degli acidi nucleici e dei loro precursori o più generalmente in quei tessuti in cui vi è attiva sintesi di DNA. La cN-II è stata purificata da diverse fonti e tutti gli enzimi mostrano simili caratteristiche cinetiche, meccanismi regolatori e specificità di substrato sebbene vi siano differenze notevoli nella massa molecolare; la forma attiva è sempre quella tetramerica ma la massa molecolare della singola subunità varia da un minimo di 42 kDa in *Artemia* (Pinto R.M., et al., 1987) a 69 kDa nel tessuto polmonare di maiale (Itoh R. & Yamanada K., 1991). Non è ancora chiara la relazione tra grado di oligomerizzazione ed attività catalitica, anche se Spychala e collaboratori suggeriscono che gli attivatori dell'enzima inducano l'associazione delle subunità, mentre gli inibitori favoriscano la dissociazione (Spycala J., et al., 1999). La 5' nucleotidasi citosolica ha anche un interesse clinico: è infatti coinvolta in maniera più o meno diretta in alcune sindromi neurologiche, come ad esempio la sindrome di Lesch-Nyan (Pesi R., et al., 2000). La cN-II può agire anche su analoghi purinici usati come profarmaci antivirali e antitumorali e sembra essere alla base dello sviluppo di alcune chemioresistenze (Dumontet C., et al., 1999) (Schirmer M., et al., 1998).

1.2 La 5' Nucleotidasi Citosolica (cN-II) e la superfamiglia HAD

La super famiglia delle aloacido dealogenasi (HAD) comprende un ampio numero di proteine in grado di catalizzare svariate reazioni chimiche. Ad oggi più di 3000 proteine, di cui 58 umane, coinvolte nel metabolismo

primario e secondario, nel trasporto di membrana, nella riparazione degli acidi nucleici e nella trasduzione del segnale, sono state inserite in questo gruppo. A fronte di una grande varietà di ruoli svolti e di una bassa omologia di sequenza, mediamente inferiore al 10%, tutti i membri della superfamiglia HAD presentano 3 motivi aminoacidici altamente conservati (motivo I, II, III) che, a causa del ripiegamento tridimensionale della catena polipeptidica si vengono a trovare vicini formando il sito attivo dell'enzima.

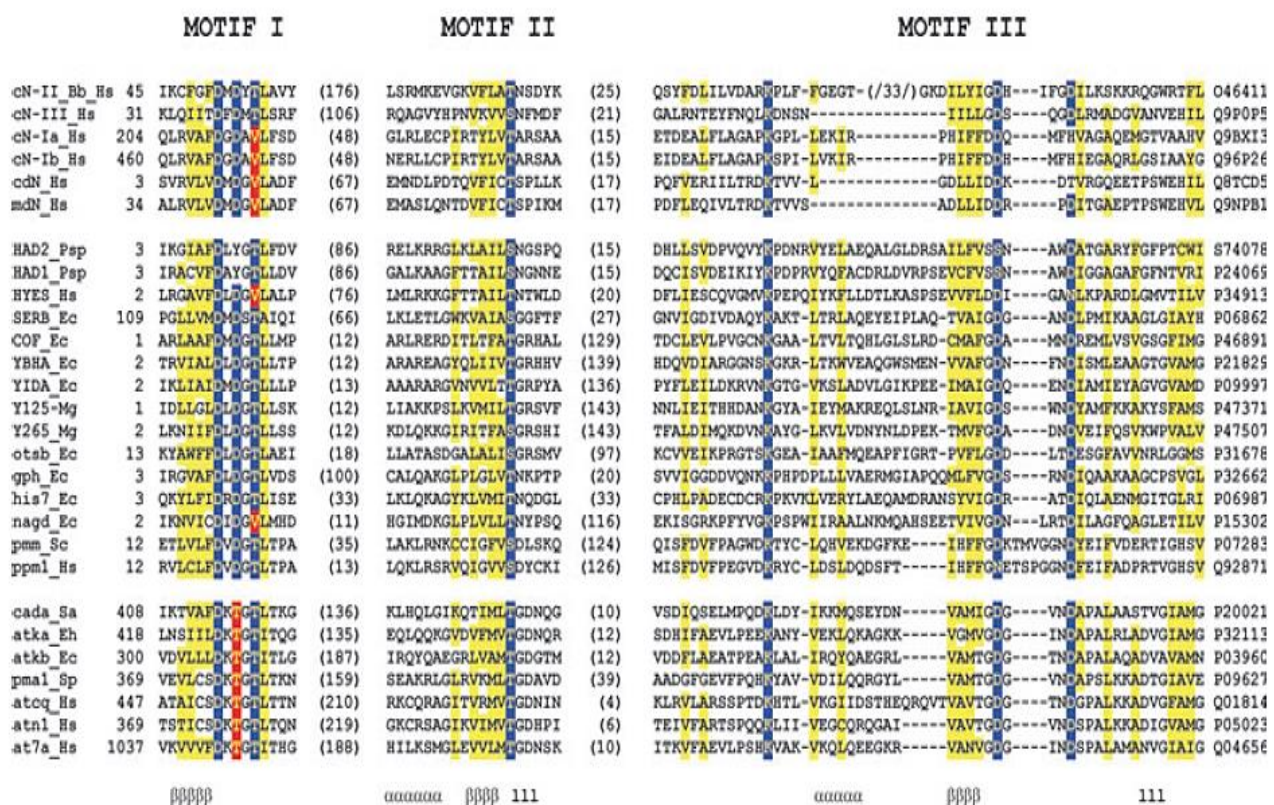


Figura 1 Allineamento multiplo delle sequenze aminoacidiche delle nucleotidasi di mammifero con membri della superfamiglia HAD. Sono riportati solo i tre motivi conservati. Il colore blu indica i residui altamente conservati, il giallo i residui idrofobici e il rosso residui alternativi che si possono trovare nel motivo I. Le proteine sono indicate secondo il loro codice SWISS-PROT. Da Allegrini et al., 2004.

Per questo motivo tutti gli enzimi del gruppo condividono una simile struttura tridimensionale e uno stesso generico meccanismo d'azione. Il

motivo I (DXDXT/V) contiene 3 residui altamente conservati (Aravind L. et al., 1998). Il primo residuo è un aspartato che è il responsabile dell'attacco nucleofilo; la sua importanza è confermata da diversi studi che hanno evidenziato come la sua sostituzione con un qualsiasi altro amminoacido comporti la perdita totale di attività enzimatica (Liu J.Q., et al., 1995), (Collet J.F., et al., 1998), (Morais M.C, et al., 2000). Il secondo residuo conservato di aspartato è invece coinvolto nella coordinazione dello ione Mg^{2+} richiesto per la corretta catalisi; inoltre è protonato e può formare un legame idrogeno con un atomo di ossigeno del gruppo fosfato. Il terzo residuo conservato del motivo è un residuo di treonina che è implicato nel corretto orientamento dell'aspartato nucleofilo. Le altre posizioni sono occupate da residui diversi a seconda dell'enzima. Separato dal motivo I da una sequenza amminoacidica di lunghezza variabile si trova il **motivo II**. Il residuo maggiormente conservato è un residuo di serina o treonina preceduto da 5 amminoacidi idrofobici; il gruppo ossidrilico presente in questa posizione è in grado di formare un legame idrogeno con l'ossigeno del gruppo fosfato del substrato (Wang W., et al., 2001) (Morais M.C, et al., 2000). Il **motivo III** è formato da un residuo di lisina fiancheggiato da due residui carichi negativamente; il compito della lisina è quello di stabilizzare le cariche negative del gruppo fosfato del substrato (Ridder I.S. & Dijkstra B.W., 1999). Completano il motivo due residui di aspartato che coordinano il cofattore metallico. Un α/β core domain, anch'esso altamente conservato, contiene il sito attivo formato da 4 loops nei quali si trovano i motivi appena descritti (Lahiri S.D., et al., 2004). Questo dominio ricorda il motivo di Rossmann ed è composto da 6 foglietti β paralleli circondati da 6 α eliche. La presenza eventuale di un secondo dominio, noto come cap domain,

permette di suddividere la famiglia HAD in 3 sottofamiglie. I membri della sottofamiglia I presentano un cap domain piccolo costituito da più α -eliche posizionate tra i loops 1 e 2, nella sottofamiglia II si trova un grande dominio a β -sandwich inserito tra il secondo e il terzo loop (Shin D.H., et al., 2003), mentre il cap domain è assente nei membri della sottofamiglia III. Queste caratteristiche di base della famiglia HAD sono il criterio di selezione per determinare se una proteina può far parte di questo gruppo, e la loro individuazione nella cN-II ha fatto sì che l'enzima venisse inserito nella famiglia. L'allineamento delle sequenze amminoacidiche della cN-II con quelle delle altre 5'-nucleotidasi citosoliche e con quelle dei principali rappresentanti delle aloacido dealogenasi ha messo in evidenza la presenza dei motivi conservati. Dal punto di vista della struttura tridimensionale, la scarsa solubilità della cN-II non consente la cristallizzazione della proteina intera; la cN-II priva di una discreta porzione carbossiterminale è stata invece cristallizzata (Wallden K., et al., 2007), ed i dati ottenuti insieme a quelli derivati dalla cristallizzazione della 5'(3')-deossiribonucleotidasi mitocondriale (cd-N) hanno confermato del tutto l'appartenenza delle nucleotidasi citosoliche alla famiglia delle aloacido dealogenasi. Studi di mutagenesi sito-specifica sono serviti per indagare sul ruolo dei motivi conservati; i risultati emersi hanno evidenziato come tutti i residui conservati svolgano un ruolo essenziale nella catalisi dal momento che sostituzioni conservative e non comportano variazioni nei parametri cinetici e in alcuni casi la perdita totale di attività. Dai dati di questi esperimenti e da quelli condotti su altri membri della famiglia HAD, come la fosfoserina fosfatasi, l'ATPasi e la mdN è stato possibile costruire un modello del sito attivo della cN-II. I due residui di aspartato del primo motivo (D52 e D54)

sono essenziali per il funzionamento dell'enzima in quanto qualsiasi sostituzione comporta perdita totale dell'attività enzimatica. L'aspartato D52 è responsabile della formazione dell'intermedio mentre il residuo D54 è coinvolto nella coordinazione del cofattore metallico; il residuo di treonina (T56) serve a orientare mediante un legame idrogeno l'aspartato nucleofilo. Il secondo motivo, rappresentato dal solo residuo di treonina (T249) è in grado di formare un legame idrogeno con un atomo di ossigeno del fosfato, stabilizzando il substrato. Nel terzo motivo il residuo di lisina 292 (K292) interagisce con l'aspartato nucleofilo influenzandone positivamente l'orientamento. Completano il sito attivo due residui di aspartato (D351 e D356) che contribuiscono alla coordinazione dello ione Mg^{2+} (Allegrini S., et al., 2004).

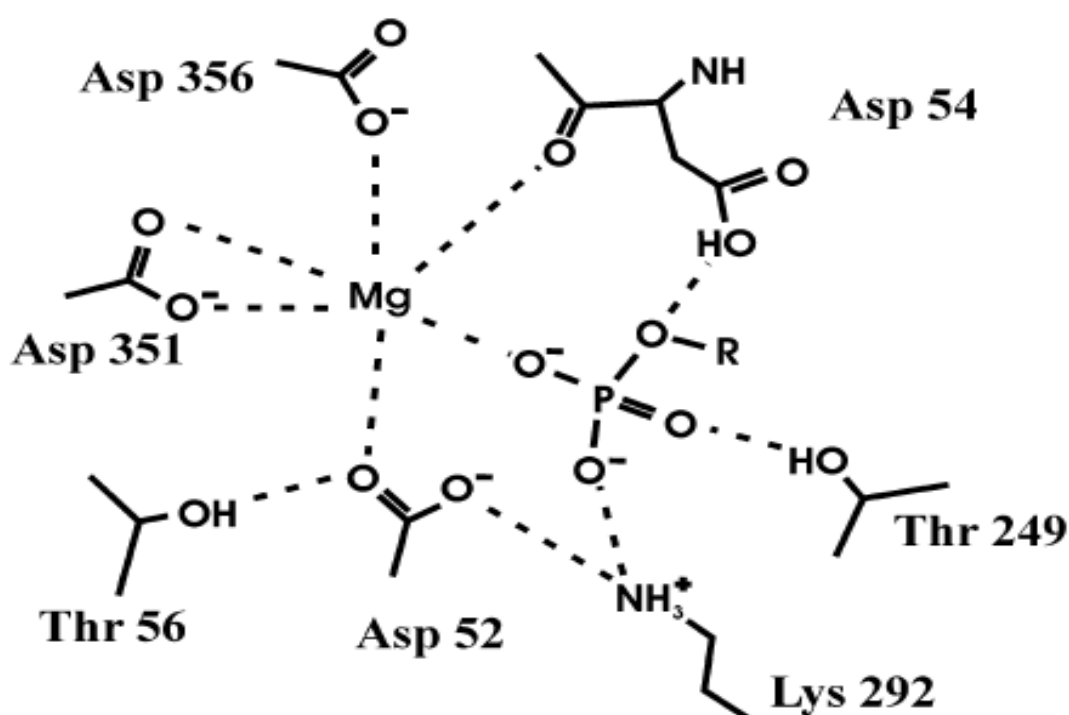


Figura 2 Sito attivo della 5'nucleotidasi citosolica II. Sono indicati gli amminoacidi maggiormente coinvolti nel mantenimento della struttura del sito attivo e nel meccanismo di catalisi. Asp 52, Asp 54 e Thr 56 fanno parte del motivo conservato I; Thr 249 fa parte del motivo conservato II; Lys 292 Asp 351 e Asp 356 fanno parte del motivo conservato III.

1.3 La 5' Nucleotidasi Citosolica (cN-II): la struttura

La maggioranza delle informazioni che si hanno oggi sulla nucleotidasi derivano dallo studio dell'enzima ricombinante bovino che mostra elevatissima omologia con quello umano; dal confronto delle sequenze nucleotidiche l'omologia è del 94 % per salire a 99,5 % se si confrontano le sequenze amminoacidiche. La nucleotidasi bovina e quella umana differiscono solo per 3 amminoacidi: le sostituzioni conservative della treonina 2 con una serina e della valina 335 con un'isoleucina e l'assenza di un residuo di glutammato nell'estremità C terminale. Si tratta di differenze del tutto ininfluenti sulle caratteristiche cinetiche, regolatorie e strutturali dei due enzimi che risultano in definitiva assumere lo stesso comportamento; inoltre la disponibilità di vettori plasmidici con il cDNA bovino permettono di ottenere buone quantità di enzima per i più svariati studi (Allegrini S., 1997). Come anticipato nei precedenti paragrafi la forma funzionante dell'enzima è quella di omotetramero; esperimenti di elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di sodio dodecil solfato (elettroforesi SDS\PAGE) hanno permesso di stimare le dimensioni della singola subunità la cui massa varia da un minimo di 42 kDa in *Artemia* (Pinto R.M., et al., 1987) a un massimo di 69 kDa (Itoh R. & Yamanada K., 1991) nel tessuto polmonare suino. La massa molecolare dell'intera proteina è stata ottenuta mediante gel filtrazione con i risultati che variano da un minimo di 165 kDa per la nucleotidasi di *Artemia* (Pinto R.M., et al., 1987), a un massimo di 265 kDa per quella del maiale (Itoh R. & Yamanada K., 1991). Studi eseguiti sulla cN-II purificata dal timo di vitello hanno messo in luce l'esistenza di due forme della cN-II, note come cN-IIA e cN-IIB, che

in elettroforesi SDS\Page migrano al peso molecolare di 59 kDa e 54 kDa. La presenza delle due forme in tutti i passaggi di purificazione e la loro stabile distribuzione hanno inizialmente indotto i ricercatori a sostenere che le due forme possano essere generate a seguito di modifiche post-traduzionali (Pesi R., et al., 1998). Successivi studi hanno chiarito che un evento proteolitico è alla base della generazione delle due forme. (Allegrini S., et al., 2004). Come accennato nel paragrafo precedente, gli studi strutturali sono stati eseguiti su una proteina ottenuta esprimendo in cellule *Rosetta2DE* i primi 536 residui della proteina, con l'aggiunta di un sito di taglio per la trombina e di una coda di istidine; il prodotto è stato purificato e cristallizzato in una soluzione di 1,8 M di MgSO_4 , 0,1 M TRIS pH 8,5, 50 mM PO_4^{2-} . Sono state così ottenute tre strutture: la proteina in condizioni native in presenza di Mg^{2+} e fosfato; la proteina in condizioni native in presenza di Mg^{2+} , fosfato e adenosina; la proteina in presenza di Mg^{2+} , fosfato e BeF_3 . Il BeF_3 è stato usato per mimare la formazione dell'intermedio enzima-fosfato, come precedentemente documentato per la risoluzione di altre nucleotidasi appartenenti alla famiglia HAD (Rinaldo-Matthis A., et al., 2002) (Amici A., et al., 2005) (Bitto E., et al., 2006); l'adenosina è servita per l'individuazione di possibili siti effettori dell'enzima. Dall'analisi di queste strutture si sono avute conferme di quanto già si sapeva o si ipotizzava sulla struttura dell'enzima (forma ad omotetramero, appartenenza alla superfamiglia HAD, presenza del core domain con il motivo di Rossmann, presenza del cap domain), ma anche nuove informazioni su come i monomeri interagiscano tra loro e sulla posizione dei siti di legame per i modulatori allosterici.

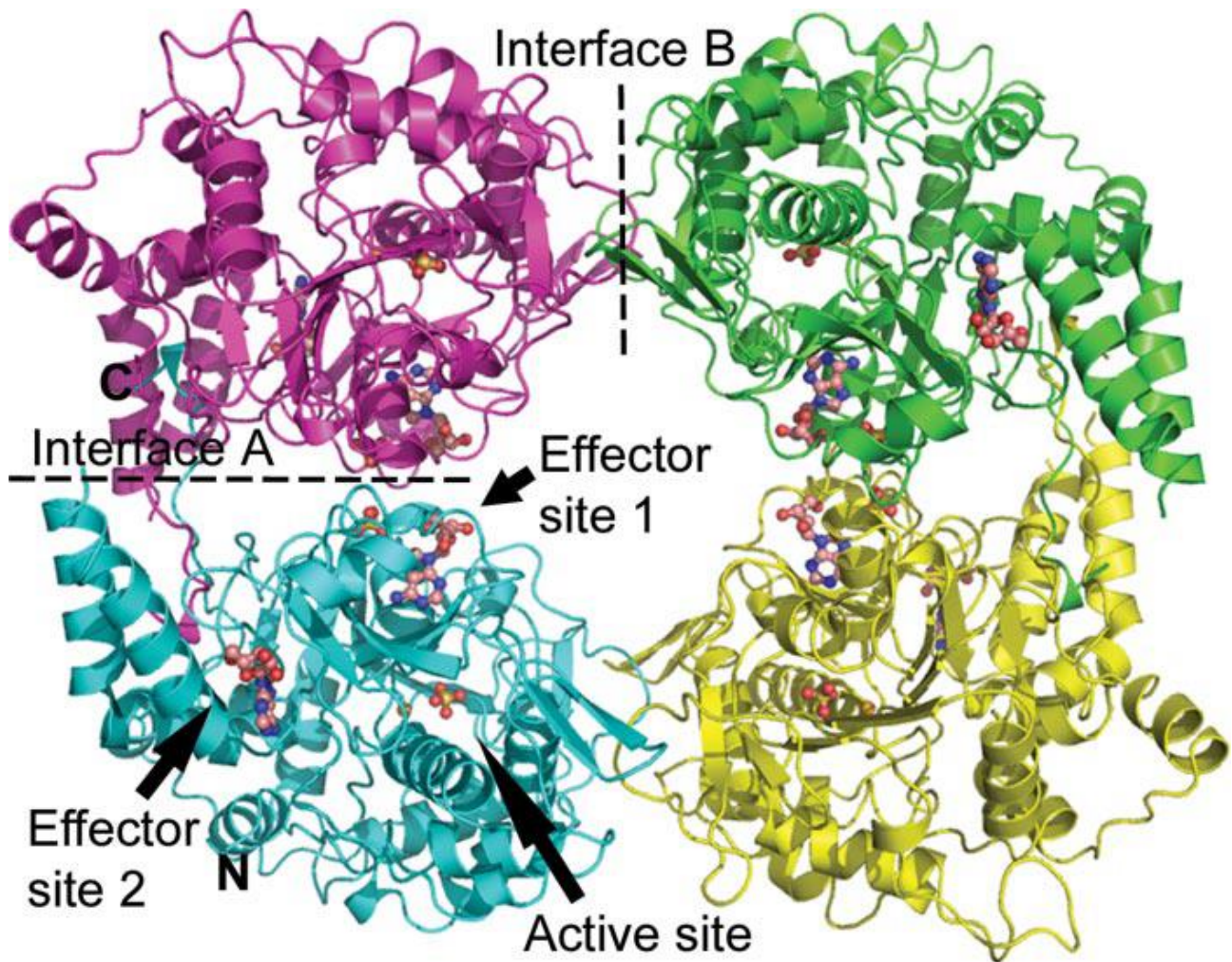


Figura 3 Struttura tetramERICA della cN-II. Le singole subunità sono indicate con 4 colori diversi; sono riportati la posizione del sito attivo, di due ipotetici siti effettori e le interfacce di interazione tra monomeri (interface A) e tra dimeri (interface B). Da Wallden et al. ,2007

È stata individuata un'interfaccia di interazione tra monomeri, denominata interfaccia A, e una di interazione tra i dimeri, denominata interfaccia B. La prima è costituita da 53 residui amminoacidici di cui 19 impegnati nella formazione di legami ad idrogeno e 4 nella formazione di ponti salini con i residui della subunità adiacente. I ponti salini sono stati individuati tra i residui di Arginina 363 e Aspartato 145 e tra l'Arginina 442 e Glutammato 482. L'interfaccia di interazione tra i dimeri è data da 28 residui amminoacidici di cui 8 sono impegnati in legami idrogeno mentre non sono stati individuati ponti salini. Per capire come siano disposti i monomeri nel

cristallo se ne consideri uno solo: ogni subunità adiacente corrisponde ad una sua rotazione di 180° rispetto all'interfaccia di contatto. Il sito attivo si trova all'interfaccia tra core e cap domain e la sua struttura amminoacidica è in linea con quella proposta precedentemente a seguito di numerosi studi biochimici. Il core domain ha una struttura più complessa di quanto ci si aspetta data da 8 α -eliche e 8 foglietti- β con l'aggiunta di altre 5 ulteriori α -eliche e loops. Per quanto concerne i siti effettori, dallo studio dei siti di legame delle molecole di adenosina Wallden e colleghi hanno identificato un ipotetico sito effettore 1 ed un ipotetico sito effettore 2 (Wallden K., et al., 2007). Il primo sito è localizzato in prossimità dell'interfaccia A ed è completamente occupato dalla molecola di adenosina. Questa si posiziona tra i residui di fenilalanina 354 e isoleucina 152, formando legami idrogeno con la glutammina 453 e l'asparagina 152; nel sito si trovano due residui di arginina (R456 e R144) che legano uno ione solfato, utilizzato da Wallden e colleghi per mimare il legame del fosfato. Tutto ciò indicherebbe il sito effettore 1 come possibile sito di legame per i nucleotidi adenilici. Studi biochimici hanno poi confermato la bontà di tale predizione, con il sito che sembrerebbe maggiormente specifico per ADP e Ap₄A che per l'ATP (Pesi R., et al., 2010). Nel secondo ipotetico sito effettore la molecola di adenosina si localizzerebbe tra i residui di fenilalanina 127 e istidina 428 e l'interazione sarebbe mediata da legami idrogeno con la stessa istidina 428 e le metionine 432 e 436. Il legame dell'effettore avverrebbe in maniera meno preciso e tutt'oggi ci sono dubbi sull'effettiva esistenza del sito dal momento che studi condotti sui mutanti M436W, M436V, F127E, H428D hanno evidenziato come le mutazioni non modifichino la risposta dell'enzima agli effettori (Pesi R., et al., 2010). Sebbene il quadro sulla

struttura della cN-II sia oggi molto più chiaro che in passato rimangono tuttavia dei punti su cui far luce, ricordando anche che la proteina espressa e cristallizzata da Wallden e collaboratori non è la forma completa ma è priva di 25 amminoacidi C-terminali. Questi residui comprendono sia la coda C-terminale ricca di cariche negative, il cui ruolo nella regolazione è stato più volte dibattuto (Allegrini S., et al., 2004) (Spycala J., et al., 1999), sia il residuo di cisteina 547 anch'esso coinvolto nei sistemi di regolazione. Dato il contributo di questi residui alla regolazione dell'attività enzimatica è possibile che la struttura cristallografica ad oggi disponibile non possa fornire una spiegazione totale della regolazione della cN-II.

1.4 La 5' Nucleotidasi Citosolica (cN-II): meccanismo d'azione

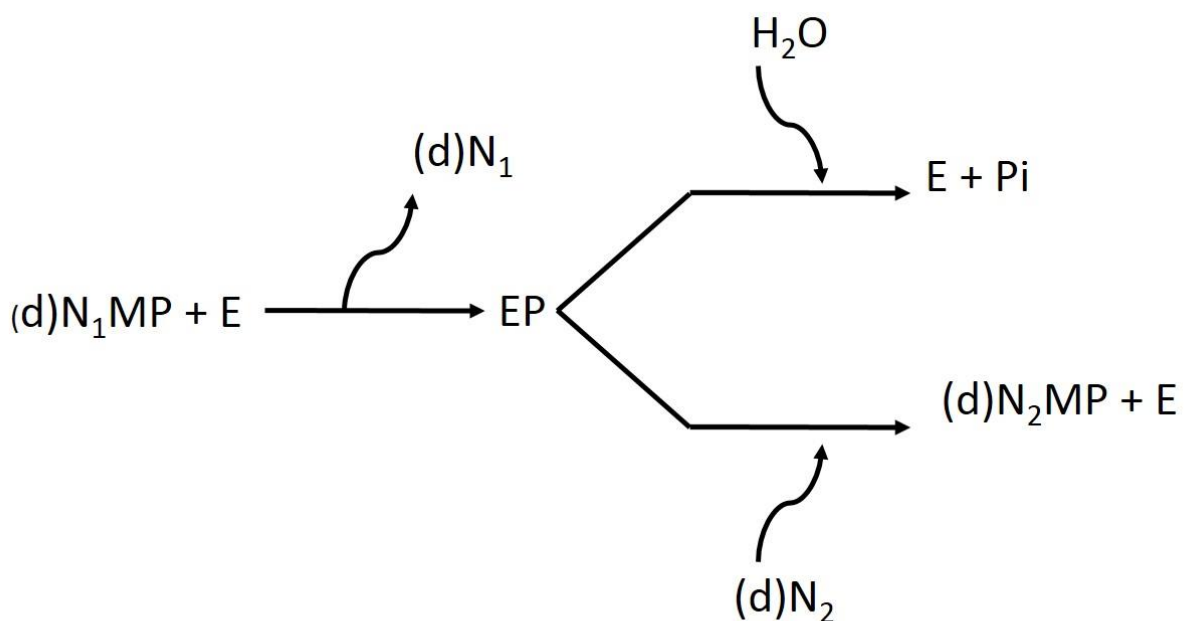


Figura 4 Meccanismo d'azione della cN-II. $(d)N_1MP$ indica un (deossi)nucleoside 5' monofosfato donatore del gruppo Pi ; $(d)N_1$ (deossi)nucleoside rilasciato al termine della reazione fosfatasi; $(d)N_2$ indica un (deossi)nucleoside accettore del gruppo Pi ; $(d)N_2MP$ indica il (deossi)nucleoside 5' monofosfato che si genera al termine della reazione fosfotransferasi; EP indica l'intermedio fosforilato dell'enzima

I substrati principali della cN-II sono i nucleosidi monofosfato IMP e GMP e i loro deossiderivati. Questo enzima oltre a possedere una attività fosfatasica, può anche trasferire il fosfato ad un opportuno accettore (attività fosfotransferasica). Il meccanismo di base prevede che durante l'idrolisi di un nucleoside monofosfato l'enzima rimanga fosforilato rilasciando come primo prodotto il nucleoside; successivamente il gruppo fosfato legato all'enzima può essere idrolizzato da una molecola d'acqua oppure può essere trasferito ad un nucleoside accettore. Da tempo i ricercatori avevano ipotizzato che il meccanismo d'azione dell'enzima prevedesse la formazione di un intermedio enzima-fosfato; si trattava però di un'ipotesi basata solamente su indizi cinetici dal momento che si assisteva all'inibizione esercitata dall'inosina, un buon accettore di fosfato, sull'idrolisi dell'IMP (Worku Y. & Newby A.C., 1982) (Tozzi M.G., et al., 1991). Inoltre la formazione di un intermedio di questo tipo era già stata dimostrata per svariati enzimi in grado di trasferire gruppo fosfato come la glucomutasi (Joshi J.G. & Handler P., 1969) e la fosfogliceromutasi (Fersht A., 1989). La conferma che effettivamente il meccanismo d'azione della cN-II preveda la formazione di un intermedio fosforilato si è avuta dopo diversi anni grazie a studi condotti con $[^{32}\text{P}]\text{IMP}$, un substrato radioattivo utilizzabile dalla cN-II; in questo studio l'aggiunta di una soluzione di SDS alla miscela di reazione blocca l'intermedio, in modo tale che la proteina fosforilata, dopo la corsa elettroforetica, possa essere messa in evidenza su lastra autoradiografica (Baiocchi C., et al., 1996). Per l'attività catalitica l'enzima richiede la presenza di Mg^{2+} anche se altri cationi bivalenti come Mn^{2+} e Ni^{2+} possono avere la stessa funzione, sebbene con minor efficienza (Itho R., 1993). Da un punto di vista pratico l'attività nucleotidasica della

cN-II può essere seguita misurando la quantità di nucleoside prodotto in presenza di un nucleoside accettore di fosfato, mentre l'attività fosfotransferasica viene misurata in base alla quantità di nucleoside monofosfato che si forma a partire dal nucleoside accettore. Se la base purinica del nucleotide, utilizzato come donatore di fosfato, è diversa da quella del nucleoside accettore è possibile seguire nella stessa miscela di reazione entrambe le attività; questo accorgimento è stato usato per studiare l'effetto di attivatori e inibitori sulle velocità delle due reazioni (Allegrini S., et al., 1993).

1.5 La 5' Nucleotidasi Citosolica (cN-II): la regolazione

L'attività della cN-II è controllata da un complesso sistema di regolazione che prevede l'intervento di fattori che possono influenzare l'attività enzimatica totale o far prevalere una delle due attività, fosfotransferasica o nucleotidasica, sull'altra. I principali modulatori allosterici sono l'ATP, l'ADP e il 2,3 bifosfoglicerato (BPG) in qualità di attivatori, mentre il principale inibitore è il fosfato inorganico (Pi). Anche altri composti come i polifosfati, in particolare la diadenosina tetrafosfato (Ap_4A) (Marques A.F.P., et al., 1998), e il decavanadato (Le Hir M., 1991) possono agire come attivatori dell'enzima. Il principale attivatore allosterico è l'ATP il cui effetto si manifesta con un aumento della velocità massima sia dell'attività nucleotidasica che di quella fosfotransferasica; sebbene sia quest'ultima reazione ad essere maggiormente influenzata dall'attivatore, l'analisi dell'attività catalitica ha indicato che in presenza di ATP l'enzima agisce come una idrolasi (Pesi R., et al., 1994). La K_{50} dell'ATP è di circa 2 mM un valore inferiore a quelli fisiologici delle cellule (4,5 mM). L'ATP ha

anche un ruolo protettivo contro l'inattivazione termica e l'azione della tripsina (Itho R., 1993). Un effetto paragonabile a quello dell'attivatore può essere ottenuto aggiungendo sali come KCl, NaCl o LiCl in concentrazioni superiori a 300 mM così come acidi carbossilici quali succinato, malato e fumarato (Itho R., et al., 1981). È probabile che l'azione attivatrice e stabilizzatrice dei sali sia attribuibile alla forza ionica, l'effetto della combinazione ATP e sali è additivo (Tozzi M.G., et al., 1991), (Pesi R., et al., 1994), (Spycala J., et al., 1999). Anche il BPG è un buon attivatore della cN-II. La sua K_{50} è pari a 1 mM perciò è probabile che il suo effetto fisiologico sia confinato ai soli eritrociti, le uniche cellule dove è possibile che questo metabolita raggiunga la concentrazione attivatrice. Il principale inibitore dell'enzima è il fosfato inorganico (P_i) che esplica la sua azione a concentrazioni fisiologiche (5 mM) causando un aumento della K_m per i substrati in particolare per IMP. I nucleotidi adenilici ATP e ADP sono in grado di rimuovere l'inibizione esercitata dal fosfato; a parità di concentrazione di P_i (5 mM) i livelli fisiologici di ATP rimuovono fino all'85% dell'inibizione mentre quelli di ADP rimuovono solamente il 40% dell'inibizione. Si può quindi concludere che sebbene il ruolo dell'ADP sia simile a quello dell'ATP, l'effetto attivatore di quest'ultimo è decisamente più forte (Pesi R., et al., 1994). È probabile che in condizioni fisiologiche la cN-II risenta solamente dell'azione dell'ATP, come attivatore, e del fosfato inorganico come inibitore. L'analisi dell'efficienza catalitica dell'enzima in presenza di 4,5 mM di ATP e 5 mM di P_i ha indicato che la nucleotidasi agirebbe quasi esclusivamente come una fosfotransferasi se non fosse per l'alta K_m per inosina (1 mM) che rappresenta il fattore limitante. La possibilità che la cN-II operi *in vivo* una fosforilazione di nucleosidi

sembra dipendere dalla sola presenza di un idoneo accettore di fosfato (Pesi R., et al., 1994). Non solo il controllo allosterico ma anche l'ambiente di reazione influenza l'azione dell'enzima. Le proprietà cinetiche della nucleotidasi sono dipendenti dal grado di acidità della soluzione; è curioso notare come le due attività dell'enzima abbiano pH ottimali diversi: l'attività fosfatasica ha un optimum a pH 6,5 , mentre l'attività fosfotransferasica richiede un pH di 7,4. Da questi dati si può dedurre che il trasferimento del fosfato ad un accettore è favorito dal pH cellulare (Banditelli S., et al., 1996). Altro fattore con un effetto significativo sull'attività della cN-II è dato dalle condizioni ossido-riduttive dell'ambiente di reazione. È stato dimostrato che l'aggiunta alla miscela di reazione dell'agente riducente ditioneitrato (DTT) è necessaria per ottenere la massima funzionalità dell'enzima; a conferma di ciò sono stati eseguiti saggi in condizioni ossidanti, mediante l'aggiunta di 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DNTB): in queste condizioni la cN-II perde attività che è però recuperata a seguito dell'aggiunta di DTT (Baiocchi C., et al., 1996). Questi risultati fanno supporre il coinvolgimento di gruppi sulfidrilici (-SH) di residui di cisteina nel mantenimento della struttura attiva dell'enzima (Allegrini S., et al., 2004). Le due forme A e B in cui la cN-II esiste sono state studiate dal punto di vista della regolazione che è risultata essere differente nelle due forme. La forma A di peso molecolare maggiore (59 kDa) è regolata dall'ATP e dall'ADP, che competono per lo stesso sito di legame, e dal BPG verso il quale l'affinità è molto alta. La forma B di peso molecolare minore (54 kDa) presenta un sito di legame distinto per ogni attivatore e mostra attivazione sinergica da parte di BPG e ADP (Pesi R., et al., 1998). Per quanto concerne gli effetti dell'ambiente di reazione la forma B è completamente attiva anche

in assenza di DTT, la cui presenza è invece richiesta dalla forma A affinché l'enzima possa essere pienamente attivo (Allegrini S., et al., 2004). La diversa sensibilità nei confronti del DTT e più generalmente nei confronti delle condizioni ossido-riduttive è stata spiegata grazie alla caratterizzazione strutturale delle due forme. Nella forma A è stato individuato un ponte disolfuro (S-S) che nasce per ossidazione spontanea dei gruppi sulfidrilici delle cisteine 175 e 547; questo ponte viene rotto dal DTT. Nella forma B il taglio proteolitico che la genera elimina un frammento all'estremità C-terminale che va dal residuo amminoacidico 526 a quello 560: mancando quindi la cisteina 547 il ponte disolfuro non si forma e questo spiega la diversa sensibilità al DTT. Queste osservazioni possono avere anche un significato funzionale: la contemporanea presenza delle due forme renderebbe la cN-II meno sensibile ai cambiamenti dello stato redox dell'ambiente cellulare (Allegrini S., et al., 2004). Rimangono comunque dei punti da chiarire e la totale comprensione dei meccanismi regolatori dell'enzima potrebbe aprire nuove prospettive per poter meglio definire gli aspetti fisiologici della cN-II.

1.6 La 5' Nucleotidasi Citosolica (cN-II): ruoli fisiologici

La distribuzione ubiquitaria, la conservazione filogenetica e il raffinato meccanismo di controllo sono indici dell'estrema importanza dell'enzima per il metabolismo cellulare. A ulteriore conferma non sono mai stati osservati tessuti o linee cellulari completamente privi dell'attività di questa nucleotidasi (Tozzi M.G., et al., 1991).

Da un punto di vista fisiologico-funzionale è opinione diffusa che la funzione principale della cN-II sia il controllo dei livelli intracellulari di

IMP sintetizzato ex novo o derivante dalla degradazione dell'ATP. L'IMP è il precursore dei nucleotidi purinici che oltre a essere impiegati per la sintesi di acidi nucleici svolgono anche ruoli in qualità di regolatori metabolici e molecole segnale sia intracellulari che extracellulari; quindi il controllo dei suoi livelli ad opera della cN-II ha ripercussioni che vanno ben oltre la sola regolazione del metabolismo dei nucleotidi purinici.

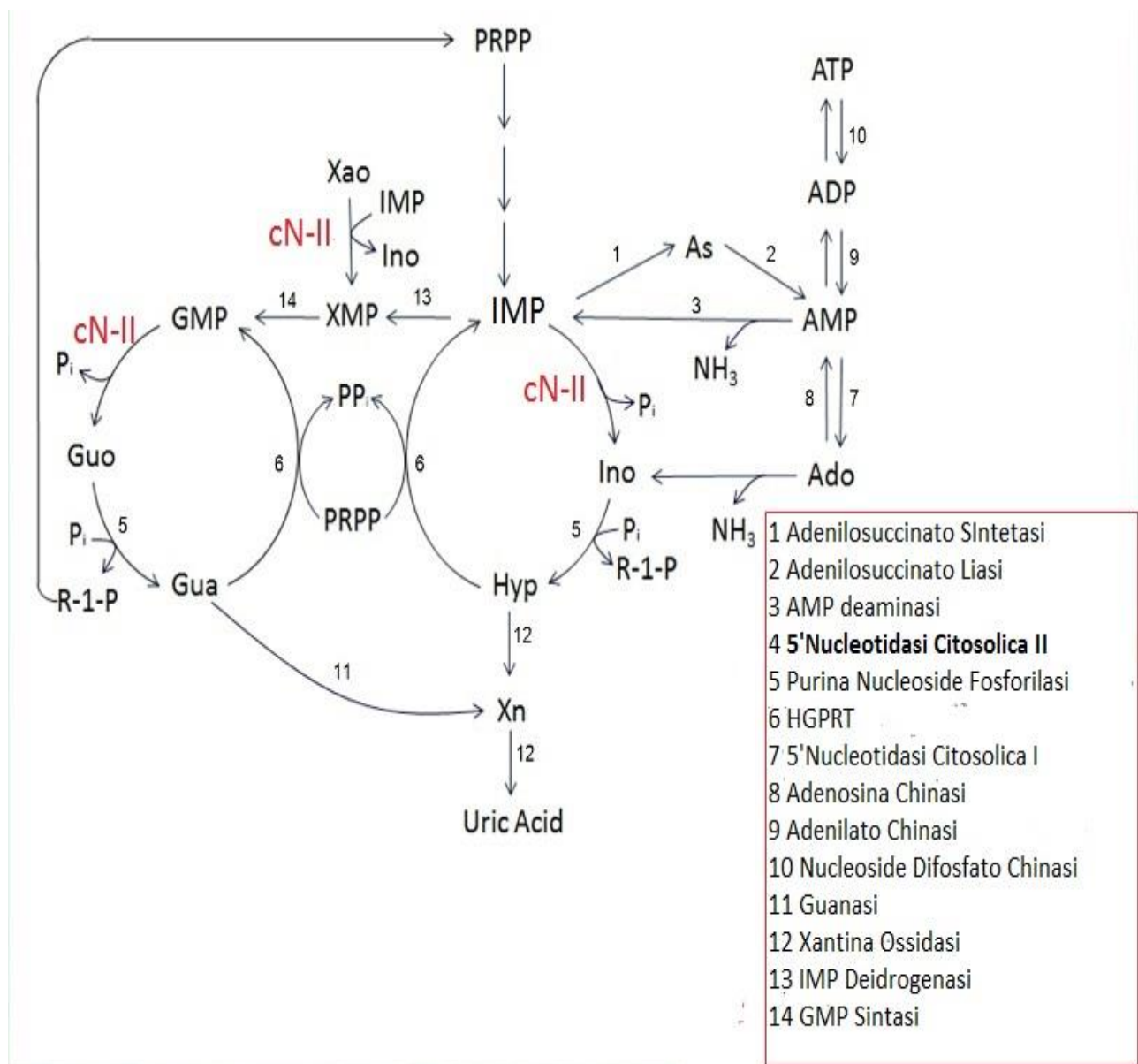


Figura 5 Vie di sintesi, degradazione e recupero dell'IMP. As: Adenilosuccinato. Ado: Adenosina. INO: inosina; Hyp: ipoxantina; XMP: xantosina monofosfato; Guo: guanosina; Gua: guanina; Xn: xantina. PRPP: 5-fosforibosil-1-pirofosfato

In presenza di alta carica energetica l'enzima agisce sull'IMP in eccesso idrolizzandolo a inosina, che a sua volta è scissa in ribosio-1-fosfato e ipoxantina che è successivamente trasformata in acido urico. Quando invece si verificano condizioni di bassa carica energetica la scarsa disponibilità di ATP e l'aumentata concentrazione di P_i rendono la cN-II meno attiva e incapace di idrolizzare l'IMP, evitando così che un nucleo purinico possa essere perso sotto forma di inosina o ipoxantina diffusibili (Berman P.A., et al., 1988) (Barsotti C., et al., 2003). Negli uccelli è stato osservato come un aumento dell'apporto proteico causi un incremento dell'attività della cN-II a livello epatico, in modo tale che l'eccesso di azoto (N) derivante dalla degradazione degli amminoacidi possa essere escreto come acido urico, la cui formazione passa per l'IMP (Itoh R. & Tsushima K., 1972) (Itoh R. & Tsushima K., 1974). Sembra che la cN-II possa svolgere un ruolo simile anche nei mammiferi defosforilando l'eccesso di IMP prodotto a seguito di un aumentato apporto proteico (Itoh R., 1993). Nei tessuti con attiva sintesi di acidi nucleici si riscontra un'alta attività della cN-II, cosa che suggerisce che il ruolo dell'enzima possa essere anche anabolico oltre che catabolico; la nucleotidasi potrebbe, grazie alla sua attività fosfotransferasica, trasferire il gruppo fosfato dall'IMP alla deossi-inosina producendo dIMP che a sua volta la cellula può facilmente convertire in dAMP e dGMP (Tozzi M.G., et al., 1991). La cN-II partecipa inoltre al “ciclo delle ossipurine”, una via metabolica ciclica che regola sia i livelli di IMP e GMP che quelli di ribosio-1-fosfato e fosforibosilpirofosfato (PRPP), che a loro volta sono importanti per le vie di recupero e di sintesi di purine e pirimidine. In questo ciclo l'inosina o la guanosina prodotte dalla cN-II sono oggetto dell'azione della purina nucleoside fosforilasi (PNP) che le scinde in ipoxantina o guanina e

ribosio-1-fosfato; le due basi sono substrato dell'ipoxantina-guanina fosforibosiltransferasi (HGPRT) assieme al PRPP generando IMP o GMP. È la cN-II che determina la velocità del ciclo e di conseguenza il destino dell'anello purinico del nucleoside e la disponibilità di PRPP e ribosio-1-fosfato. Quando il rapporto $[Pi]/[ATP]$ è basso, come accade fisiologicamente, il ciclo può procedere ad alte velocità e la concentrazione di PRPP rimane bassa; se il rapporto $[Pi]/[ATP]$ si inverte, come accade ad esempio in cellule ischemiche, l'azione della cN-II rallenta ed è possibile l'accumulo di PRPP da utilizzare per vie di sintesi e/o di recupero delle purine (Ipata P.L. & Tozzi M.G., 2006).

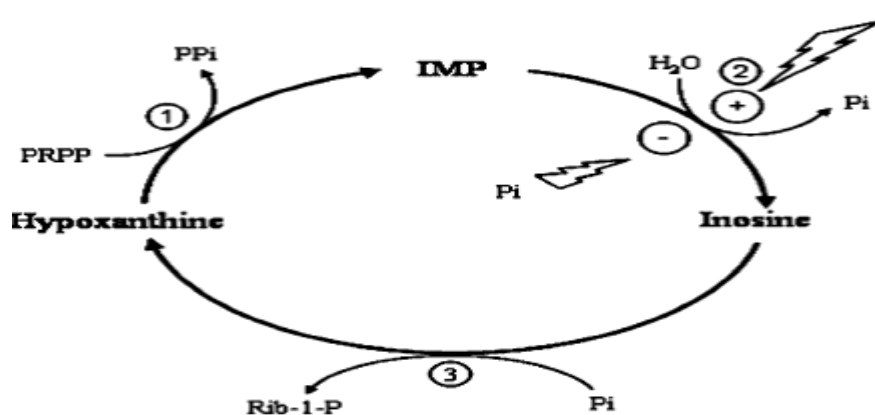


Figura 6 Ciclo delle ossipurine. 1) HGPRT, 2) cN-II, 3) PNP Da Ipata P.L. e Tozzi M.G., 2006.

Studi condotti su estratti di cervello di ratto hanno messo in evidenza come la cN-II intervenga nella regolazione dei pools intracellulari dei nucleosidi e nucleotidi adenilici (Ipata P.L. & Tozzi M.G., 2006). Più nel dettaglio l'AMP derivante dall'idrolisi di ATP può essere catabolizzato secondo due vie distinte, il "pathway dell'adenosina" e il "pathway dell'IMP". Nel primo caso l'AMP è defosforilato ad adenosina dalla cN-I, mentre l'adenosina deaminasi converte l'adenosina in inosina. Nel secondo caso invece l'AMP è deaminato dall'adenilato deaminasi a IMP, che a questo punto diventa

substrato della cN-II con la produzione finale di inosina. La scelta tra i due pathway dipende dalla concentrazione di ATP, il principale attivatore allosterico della cN-II. In presenza di 3,6 mM di ATP, l'AMP da esso derivato viene catabolizzato secondo la via dell'IMP, senza quindi portare a un accumulo di adenosina. A concentrazioni inferiori di ATP (0,5 mM), l'AMP prodotto segue invece la via dell'adenosina, con accumulo di quest'ultima. La cN-II è coinvolta nelle via di recupero della xantosina; in questo caso l'enzima trasferisce il gruppo fosfato dall'IMP alla xantosina formando XMP che a sua volta viene convertito in GMP. Con queste reazioni la cellula potrebbe essere in grado di evitare la riduzione NAD^+ dipendente dell'IMP a XMP da parte dell'IMP Deidrogenasi; questo fenomeno è molto evidente durante la riperfusione poiché in condizioni anossiche l'accumulo di IMP, derivante dal catabolismo dell'ATP, fornisce il substrato per l'attività fosfotransferasica (Barsotti C., et al., 2005).

Per poter approfondire ulteriormente il ruolo fisiologico della proteina sono stati condotti sia esperimenti di sovra-espressione che di silenziamento della cN-II. La sovra-espressione dell'enzima è stata studiata da Rampazzo e collaboratori nelle cellule epiteliali del rene embrionale umano; il dato più importante emerso dallo studio è l'impossibilità di ottenere una sovraespressione di 10 volte superiore ai livelli basali di proteina, imputabile ad un possibile effetto negativo sulla vitalità cellulare della sovra-espressione della cN-II (Rampazzo C., et al., 1999). L'effetto del silenziamento mediato dall'RNAi è stato studiato su cellule di astrocitoma (ADF); la scelta di questo modello sperimentale è stata fatta in quanto sono noti molti disturbi neurologici associati al metabolismo purinico (Camici M., et al., 2010), facendo pensare che questi composti abbiano un ruolo

chiave nello sviluppo e nel funzionamento del sistema nervoso centrale. Lo studio ha evidenziato come la mortalità cellulare aumenti sensibilmente quando i livelli di espressione scendono del 40% rispetto ai controlli; inoltre è stato dimostrato che a seguito dei cali di espressione della cN-II si ha attivazione delle vie apoptotiche con l'intervento della caspasi-3; è interessante notare come non ci siano rilevanti variazioni nei pools di nucleotidi o nucleosidi a seguito del silenziamento parziale di cN-II. (Careddu M.G., et al., 2008). Recentemente, la cN-II è stata espressa anche nel lievito *Saccharomyces Cerevisiae* per studiare su un modello eucariotico semplificato l'effetto dell'espressione della nucleotidasi sulla crescita cellulare e la riparazione del DNA. Va ricordato che il genoma del lievito non codifica per la cN-II, sebbene in *S.Cerevisiae* sia stata individuata una proteina (ISN-1p) che possiede attività nucleotidasica e assume una struttura tetramERICA al pari della nucleotidasi, ma con caratteristiche funzionali molto diverse (Itoh R., et al., 2003). I risultati hanno evidenziato come l'espressione dell'enzima in lievito causi una variazione nel pool di ribonucleotidi monofosfato e trifosfato e soprattutto riduca la capacità del microorganismo di operare la ricombinazione omologa (Allegrini S., et al., 2013).

1.8 La 5' Nucleotidasi Citosolica (cN-II): l'interesse clinico

L'interesse clinico della cN-II è dovuto principalmente al coinvolgimento dell'enzima in sindromi neurologiche, su tutte la sindrome di Lesch-Nyan, e alla capacità di metabolizzare, e quindi di attivare o inattivare, analoghi di nucleosidi e nucleotidi usati nelle terapie antitumorali e antivirali.

La sindrome di Lesch-Nyan è uno dei disturbi metabolici più studiati e comporta un grave quadro patologico con i pazienti che mostrano forte ritardo mentale, rallentato sviluppo motorio e tendenze all'autolesionismo. La malattia è dovuta alla totale assenza dell'enzima ipoxantina-guanina fosforibosiltransferasi (HGPRT). Diversi studi hanno dimostrato come i tessuti privi dell'HGPRT mostrino severe alterazioni nel metabolismo dei nucleotidi purinici come accumulo di PRPP, aumentata sintesi *de novo* di nucleotidi e un incremento nella produzione e nell'escrezione di ipoxantina (Pelled D., et al., 1999). Negli eritrociti di persone affette da questa sindrome si riscontrano inoltre accumulo di 5'-amino-4 imidazolocarbamide riboside 5'-monofosfato (AICAM o ZMP). Lo ZMP è un intermedio precursore dell'IMP nella sintesi *de novo* e la sua presenza nei globuli rossi, che sono privi di sintesi *de novo*, può essere spiegata ipotizzando un aumentato tasso di questa via in altri tessuti. Lo ZMP, defosforilato da enzimi cellulari a Z-riboside, diventa libero così di diffondere nei globuli rossi dove è nuovamente fosforilato (Sidi Y. & Mitchell B.S., 1985). Negli eritrociti e nei fibroblasti di persone affette dalla sindrome di Lesch-Nyan si registra anche un aumentata attività della cN-II, la quale è in grado di defosforilare lo ZMP a Z-riboside, *in vitro*, con un efficienza minore rispetto all'IMP. Inoltre nei globuli rossi si trovano alte concentrazioni di BPG, un attivatore della cN-II, che risulta così ulteriormente attiva con il risultato finale di una sovrapproduzione di Z-riboside. Questo metabolita è stato dimostrato poter indurre l'apoptosi in due linee cellulari neuronali (umana e murina) (Pesi R., et al., 2000). Tutto questo porta a supporre che l'iperproduzione di questo nucleoside, conseguente a un iperattività della cN-II, potrebbe avere effetti devastanti

sulle cellule nervose anche *in vivo* contribuendo all'insorgere dei disturbi neurologici tipici della sindrome di Lesch-Nyan (Pesi R., et al., 2000).

Altro grande interesse nei confronti della cN-II è dato dall'azione che l'enzima ha su molecole impiegate come farmaci antivirali ed antitumorali.

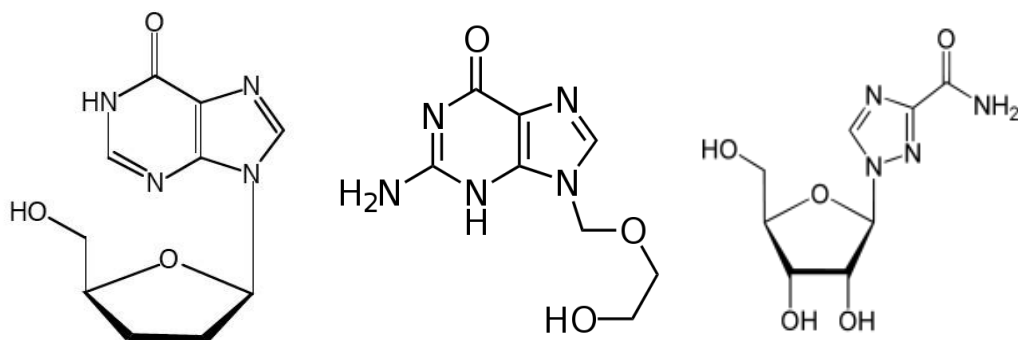


Figura 5. Nell'ordine 2'3'dideossinosina, ribavirina e acyclovir, tre farmaci antivirali verso i quali la cN-II è attiva.

Molti di questi farmaci sono analoghi di nucleotidi o nucleosidi che agiscono come pro-farmaci; vengono cioè somministrati in forma inattiva per poi essere metabolizzati e attivati dagli enzimi cellulari. La cN-II può agire sia fosforilando l'analogo, compiendo il primo passo verso l'attivazione del farmaco, oppure defosforilare la forma monofosfato della molecola impedendo di fatto l'accumulo del metabolita attivo. In questo contesto un caso particolare è quello della leucemia mieloide acuta; il farmaco maggiormente usato in questi casi è la citarabina, nota anche come ara-C. La forma attiva del metabolita è quella trifosfato (ara-CTP) che viene raggiunta nell'ambiente cellulare a seguito di una prima fosforilazione ad opera della deossicitidina chinasi (dcK) seguita da altre due fosforilazioni mediate da chinasi cellulari. Diversi studi mostrano come ci sia correlazione tra alti livelli di espressione della cN-II e una più bassa aspettativa di vita in pazienti trattati con ara-C (Galmarini C.M., et al., 2003) (Yamanuchi T., et

al., 2009). L'effetto potrebbe essere spiegato in base a polimorfismi del singolo nucleotide del gene codificante per la cN-II, molti dei quali sono stati associati a variazioni di espressione della cN-II e alla sensibilità all'ara-C in pazienti affetti da leucemia mieloide acuta (Mitra A.K., et al., 2011). Una maggior espressione dell'mRNA della cN-II nei pazienti rispetto ai soggetti sani è stata misurata anche in soggetti con alto rischio di sindrome mielodisplastica, trattati con ara-C analogamente ai pazienti colpiti da leucemia mieloide acuta. Anche in questo caso, una maggiore espressione della cN-II è correlata ad una prognosi peggiore (Suzuki K., et al., 2007). Tre analoghi dei nucleosidi, acyclovir, 2'3'-didesossiinosina e ribavarina, usati come farmaci antivirali sono substrati della cN-II. L'acyclovir (acicloguanosina, ACV) è utilizzato nelle terapie contro l'Herpes Simplex Virus. La sua specificità è data dal fatto che la sua prima fosforilazione è mediata dalla timidina chinasi, un enzima tipico del virus, perciò questa reazione può avvenire solo nelle cellule infette. Successive fosforilazioni ad opera delle chinasi cellulari convertono poi il farmaco nella sua forma attiva, che esplica la propria azione inibendo la sintesi di DNA. In pazienti trattati con il farmaco sono state però riscontrate tracce di acyclovir fosforilato anche in cellule non infettate; la causa di ciò è la cN-II che, sebbene con bassa efficienza, è in grado di riconoscere e fosforilare il farmaco. In questo modo si può spiegare la piccola quantità di acyclovir fosforilato in cellule non infettate e quindi la tossicità generale del farmaco (Keller., et al., 1985). La 2'3'-didesossiinosina è un farmaco usato principalmente contro le infezioni da HIV verso il quale esplica una potente azione inibendo la trascrittasi inversa e quindi impedendo la replicazione virale.

La 2'3'-didesossiinosina è substrato della cN-II che la fosforila favorendo il processo di attivazione (Johnson M.A. & Fridland A., 1989). La ribavirina è l'unico farmaco di cui sia stata appurata l'efficacia sia contro virus a DNA che a RNA (Sidwell R.W., et al., 1972). Agisce sia nella forma trifosfato che in quella di e mono fosfato; la cN-II catalizzandone la fosforilazione ne favorisce l'attivazione (Wu J.Z., et al., 2005).

1.8 La 5' Nucleotidasi Citosolica (cN-II) e CLAN

Tra gli aspetti poco noti della cN-II vi sono le possibili interazioni che l'enzima può avere con altre proteine e componenti cellulari. Questo aspetto della cN-II è stato fino ad oggi trascurato dalla ricerca scientifica ma potrebbe essere di grande importanza per chiarire ulteriormente gli aspetti funzionali di questa proteina. Interazioni proteiche sono state dimostrate per un'altra nucleotidasi citosolica, la cN-I, che nelle cellule muscolari si associa all'apparato contrattile in modo tale da confinare la propria azione solo dove richiesto (Sala-Newby G.B., et al., 1999); non è da escludere che anche la cN-II possa adottare comportamenti di questo tipo. A tal fine recentemente Tozzi e collaboratori hanno svolto uno studio preliminare di doppio ibrido in lievito volto a identificare eventuali possibili interattori della cN-II; lo studio (dati non ancora pubblicati, 2013) ha evidenziato una sequenza riconducibile alle proteine CLAN-A e CLAN-B come possibile sequenza in grado di interagire con la cN-II. Le proteine CLAN, note anche come Ipaf, Nlrc4 o CARD12, sono un ristretto gruppo di proteine citosoliche di recente scoperta generate come varianti di splicing dallo stesso locus genomico di 41,3 kb sul cromosoma 2. Sono state identificate 4 isoforme di CLAN, (CLAN-A, B, C, D), che si diversificano per dimensione e profilo di

espressione. Il trascritto di CLAN-A è lungo 3370 kb e codifica per una proteina di 1024 amminoacidi nella quale si identificano un dominio CARD, un dominio NACHT e un dominio LRR; il trascritto di CLAN-B è invece più corto (1374 kb) e codifica per una proteina di 359 amminoacidi che si distingue da CLAN-A per l'assenza del dominio NACHT. L'isoforma B risulta essere espressa a vari livelli in tutti i tessuti umani mentre l'espressione di CLAN-A è confinata al tessuto polmonare, al cervello, al fegato, alla prostata e ai leucociti, con l'eccezione dei linfociti nei quali non è stata riscontrata espressione (Damiano J.S., et al., 2001). Le altre due varianti di splicing, CLAN-C e CLAN-D, sono costituite dal solo dominio CARD seguito da una breve sequenza non riconducibile a nessun dominio proteico oggi noto. Si tratta di forme molto rare la cui espressione è evidente solo nel cervello, per quanto riguarda CLAN-D, e nelle cellule epiteliali del rene embrionale umano, per quanto riguarda CLAN-C (Damiano J.S., et al., 2001).

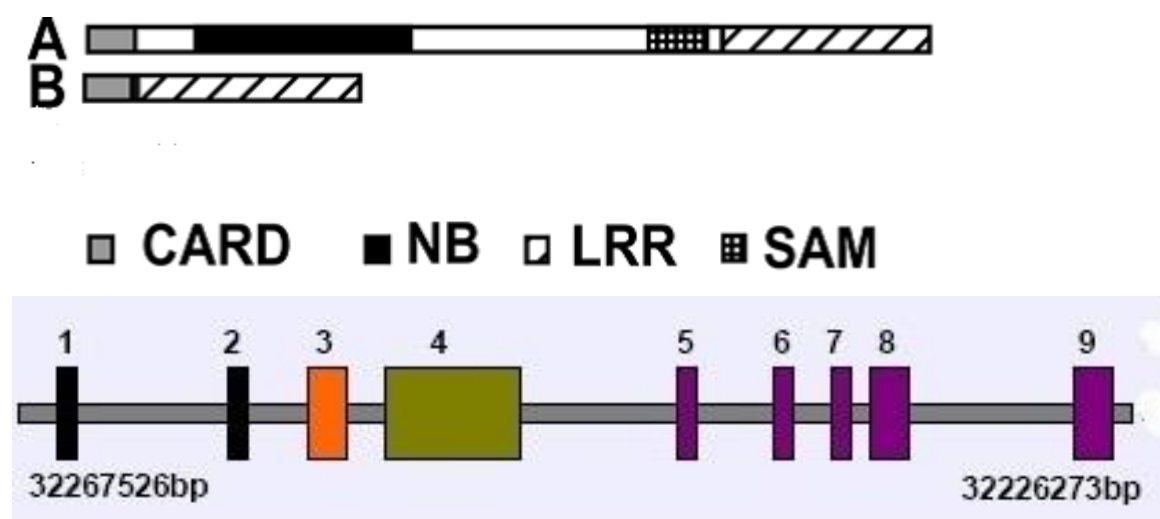


Figura 7. In alto: rappresentazione schematica della struttura di CLAN-A e CLAN-B. Modificato da Damiano J.S. et al., 2001. In basso: schema della struttura del locus genomico di CLAN sul cromosoma 2. I rettangoli indicano gli esoni.

In CLAN il dominio CARD è posto al terminale amminico ed è formato da 6 α -eliche. Questo dominio può interagire con altri domini CARD (Hofmann K., et al., 1997) (Fesik S.W., 2000) e con la caspasi 1, ma non con altre caspasi contrariamente a quanto si osserva per domini CARD di altre proteine (Poyet J.L., et al., 2001). La sua presenza è di estrema importanza per il corretto funzionamento di CLAN dal momento che se è deletato il risultato è una proteina non funzionante (Abdelaziz D.H., et al., 2010). Il dominio NACHT è dato da un P-loop che conferisce la capacità di legare nucleotidi; questo dominio è stato individuato anche in proteine coinvolte nell'apoptosi, nei meccanismi infiammatori (Koonin E.V. & Aravandin L., 2000) e nella regolazione dell'attività della caspasi 1 e del fattore nucleare-kB (NF-kB) (Damiano J.S. , et al., 2004). Ci sono evidenze che il dominio NACHT sia in grado di formare oligomeri e possa agire da scaffold per avvicinare proteine e stimolarne l'attivazione mediante il meccanismo dell'induzione per prossimità (Inohara N., et al., 2000). Il dominio LRR, posto in entrambe le proteine al terminale carbossilico, è dato da 13 ripetizioni ricche di leucina, con ciascuna ripetizione che assume una struttura data da un foglietto β associato ad un α -elica (Kobe B. & Deisenhofer J., 1999). Questa porzione della proteina sembra essere coinvolta nella regolazione dell'attività di CLAN dal momento che una sua delezione porta ad una proteina costantemente attiva (Poyet J.L., et al., 2001). La trascrizione di CLAN è modulata da diversi fattori; ad esempio è stato notato come trattamenti con raggi UV e la sovraespressione di TNF- α (Tumor Necrosis Factor α) comportino un aumento dei livelli di espressione in molte linee cellulari (Damiano J.S., et al., 2004b). Nel promotore di CLAN è stato individuato un elemento di risposta alla proteina p53 ed è

stato dimostrato che questa proteina può indurre direttamente la trascrizione di CLAN in almeno 3 linee cellulari distinte: le cellule di osteosarcoma umano (*U2OS cells*), cellule epiteliali di adenocarcinoma (*A549 cells*) e cellule di tumore al seno (*MCF7 cells*) (Sadasivam S., et al., 2005). Anche la sovra-espressione della Tirosina Fosfatasi correla con una aumentata attività trascrizionale di CLAN, cosa probabilmente imputabile all'effetto attivatore dell'enzima su p53. Da un punto di vista fisiologico CLAN è un componente base dell'infiarrosoma, un complesso proteico il cui assemblaggio porta all'attivazione della caspasi 1 (Abdelaziz D.H., et al., 2010). Le caspasi sono un gruppo di 12 proteasi a cisteina intracellulari in grado di tagliare altre proteine dopo un residuo di acido aspartico; grazie alla loro azione questi enzimi mediano importanti processi, in primis l'apoptosi e i processi infiammatori. La caspasi 1 è normalmente presente in forma inattiva ma a seguito di svariati stimoli, endogeni e non, si autoattiva tramite un taglio proteolitico raggiungendo la forma enzimaticamente attiva, cioè quella di un eterodimero composto da due subunità del peso di 10 e 20 kDa (Martinon F. & Tschopp J., 2004). La funzione della caspasi 1 è quella di promuovere il taglio e quindi l'attivazione delle citochine pro-infiammatorie interleuchina 1 β (Il-1 β) e interleuchina 18 (Il-18), e della caspasi 7; inoltre può dare inizio ad un processo di rapida morte cellulare noto come piroptosi, descritto ad oggi solo nei macrofagi e cellule dendritiche ma che potrebbe verificarsi anche in altri tipi cellulari (Van Moltke et al., 2013). L'Il-18 è importante per la produzione di interferone γ , mentre l'Il-1 β guida i processi infiammatori (Arend., et al., 2008). La caspasi 1 agisce anche su altri bersagli partecipando alla riparazione dei danni della membrana citoplasmatica e alla

secrezione di proteine secondo una via indipendente dall'usuale sistema di secrezione mediato dal reticolo endoplasmatico e dall'apparato del Golgi. (Keller M., et al., 2008) (Gurcel L., et al., 2006). L'infiannosoma è il complesso proteico che media e favorisce l'attivazione della caspasi 1, e CLAN ne è un componente di vitale importanza dato che, grazie al dominio CARD, interagisce direttamente con la caspasi. Da tutto ciò si deduce che questa proteina gioca un ruolo importante nei processi infiammatori e di morte cellulare e sono molte le evidenze in tal senso. In primo luogo CLAN è stato dimostrato essere un membro della famiglia di proteine note come **NOD-Like Receptors** (NLRs); si tratta di un gruppo di proteine coinvolte nella regolazione della risposta immunitaria innata e nei processi di morte cellulare (Sutterwala F.S. & Flavell R.A., 2009). I Nod-Like Receptors sono un vasto gruppo di recettori citosolici di cui il sistema immunitario innato è dotato per rilevare una serie di molecole segnale altamente conservate tra i patogeni note con l'acronimo di **PAMPs** (Pathogen Associated Molecular Patterns). Oltre a poter rilevare i PAMPs questi recettori sono sensibili anche ad altre molecole che agiscono in qualità di segnali di pericolo endogeni, essendo rilasciate da cellule danneggiate o stressate a seguito di infezioni; questa seconda classe di molecole è nota come **DAMPs** (Damage Associated Molecular Patterns). Alcuni NLRs sono anche coinvolti nell'embriogenesi e nello sviluppo fetale (Kuffer T.A., & Sansonetti P.J., 2011). L'importanza della famiglia NLR è testimoniata dal fatto che la maggior parte delle mutazioni note sono associate a quadri patologici come il Morbo di Crohn e la sindrome di Blau (Ting J.P., et al., 2006) (Rosenstiel P., et al., 2007). Sebbene CLAN sia un membro della famiglia dei NOD-Like Receptors ci sono alcune differenze con gli altri membri della famiglia.

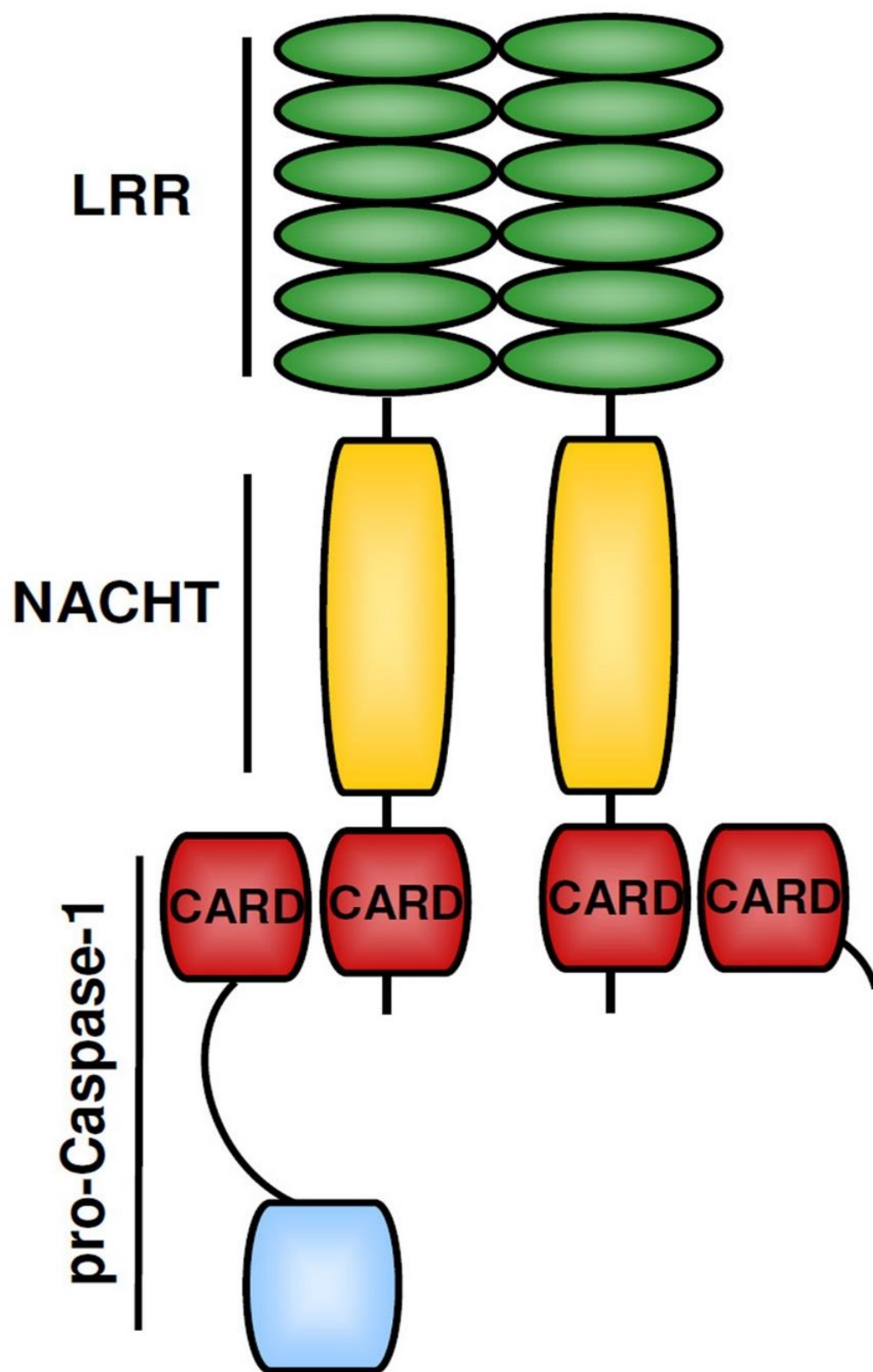


Figura 8 Struttura schematica di CLAN e della sua interazione con la pro-caspasi 1 nell'inflammosoma.

Ad esempio molti NLRs sono influenzati nella loro azione dal potassio (K^+) (Walev I., et al., 1995), mentre CLAN no (Pétrilli V., et al., 2007). Generalmente i NLRs sono in grado di legare la caspasi 1 tramite la proteina ASC, una proteina adattatrice (Martinon F., et al., 2002) (Dowds T.A., et al., 2003); al contrario CLAN lega direttamente la caspasi 1, sebbene ASC sia richiesto per il corretto taglio dell'interleuchina 1β (Mariathasan S., et al., 2004). Inoltre l'attivazione della caspasi 1 attraverso CLAN è strettamente associata alla morte cellulare, mentre altri membri della famiglia NLR pur attivando la caspasi 1 non necessariamente conducono la cellula alla morte; è perciò plausibile che CLAN sia decisiva nei processi di morte cellulare (Sutterwala F.S. & Flavell R.A., 2009). In anni più recenti è stata indagata la capacità di CLAN di attivare la caspasi 1 a seguito del riconoscimento di due particolari fattori di virulenza batterici, il sistema di secrezione di tipo 3 e il sistema di secrezione di tipo 4 (T3SS e T4SS). Sono questi ultimi i principali fattori di virulenza dei batteri patogeni Gram negativi (Hueck C.J., et al., 1998); il loro ruolo è quello di trasportare all'interno della cellula bersaglio una serie di proteine effettrici permettendo così ai patogeni di esplicare la loro azione virulenta. CLAN è in grado di rilevare questi fattori sia in modo diretto che in modo indiretto (Miao E.A., & Warren S.E., 2010). La via di segnalazione indiretta dipende dalla flagellina. Monomeri di flagellina possono essere erroneamente trasportati dai sistemi di secrezione batterici nel citoplasma della cellula ospite dove vengono rilevati da CLAN (Sun Y.H., et al., 2007). Non è chiaro come avvenga il riconoscimento della flagellina ma è possibile il coinvolgimento del dominio LRR dal momento che la sua presenza è necessaria per rilevare la flagellina di batteri come *Salmonella typhimurium* e *Legionella*

pneumophila (Franchi L., et al., 2006). La via dipendente dalla flagellina è stata dimostrata funzionare per diversi patogeni come *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* e *Legionella pneumophila* (Miao E.A., et al., 2008) (Miao E.A. et al., 2010). Nei riguardi di *L. Pneumophila* è stato dimostrato che CLAN è importante per la maturazione del fagosoma, in quanto fagosomi contenenti il batterio non sono in grado di fondersi con il lisosoma in macrofagi carenti di CLAN e Caspasi 1 (Amer A., et al., 2006). Con la via indiretta CLAN è anche in grado di segnalare la presenza di batteri flagellati nel citoplasma, come nel caso di *Listeria Monocytogenes* (Warren S.E., et al., 2008). La via diretta è invece indipendente dalla flagellina. Per capire questa seconda via è necessario ricordare che i sistemi di secrezione di tipo 3 e di tipo 4 hanno una struttura a tubo cavo data da più proteine. In questa struttura si riconoscono due parti: una ancorata alla cellula batterica che funziona da base per la seconda parte, che si protrude verso la cellula bersaglio. È stato notato che monomeri della prima parte possono essere erroneamente traslocati nel citoplasma della cellula bersaglio ed essere così riconosciuti da CLAN (Miao E.A., et al., 2010). In questi meccanismi è stato recentemente scoperto un contributo da parte di un'altra classe di proteine NOD-Like, le proteine NAIPs. Si pensa che queste possano mediare il riconoscimento della flagellina e del T3SS e l'attivazione di CLAN. Nel topo NAIP 5 e NAIP 6 agiscono sulla flagellina e NAIP 1 e NAIP 2 sul T3SS; nell'uomo invece è stata identificata una sola NAIP il cui comportamento è analogo a NAIP 1 murina (Yang J., et al., 2013) (Zhao Y., et al., 2011) (Kofoed E.M., & Vance R.E., 2011). Per quanto riguarda l'attivazione di CLAN e quindi dell'infiamosoma, nel 2012 Qu e collaboratori hanno dimostrato che la proteina può essere

fosforilata sul residuo di Serina 533, e che questa fosforilazione rappresenta un punto essenziale nel processo di attivazione (Qu Y., et al., 2012). Gli stessi ricercatori hanno poi individuato nella proteina chinasi C δ e nella PAK2 i possibili enzimi responsabili della fosforilazione (Qu Y., et al., 2012).

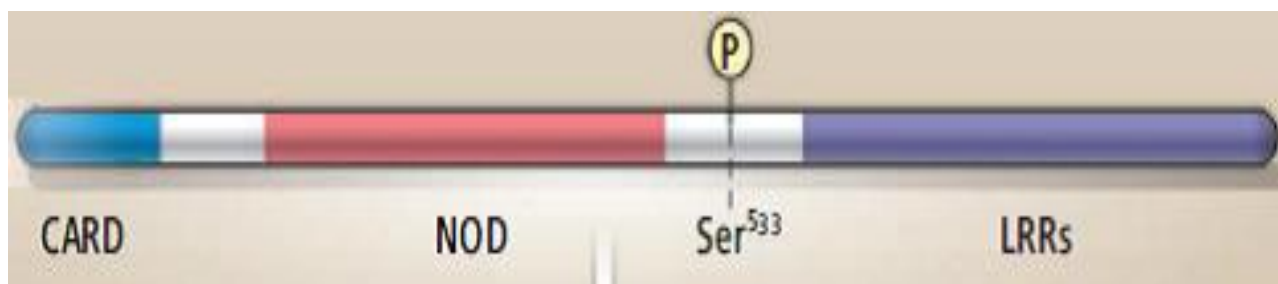


Figura 9 Struttura schematica di CLAN con indicata la posizione della Serina 533 fosforilata. Modificato da Franchi L., & Nùñez G., 2012.

Su CLAN sono stati condotti anche studi di silenziamento e di sovra-espressione. Mariathasan e collaboratori hanno dimostrato che i macrofagi derivanti da topi KO per CLAN non sono in grado di attivare la caspasi 1 nè di indurre l'apoptosi in seguito ad infezioni con *Salmonella typhimurium* (Mariathasan S., et al., 2004). La sovraespressione di CLAN in cellule THP1 (monociti umani derivanti da pazienti con leucemia monocitica acuta) comporta una maggiore capacità di queste cellule di attivare la caspasi-1; nella stessa linea cellulare l'inibizione tramite RNAi riduce sensibilmente questa capacità (Damiano J.S., et al., 2004b). Infine CLAN può interagire con lo chaperon molecolare Hsp90 e con la proteina SGT1 (Mayor A., et al., 2007) (Da Silva Correia J., et al., 2007).

1.9 Oggetto dello studio

Questo lavoro si inserisce in un contesto più ampio, ovvero quello di identificare i possibili partner per interazioni proteiche con la cN-II, al fine di migliorare le conoscenze che si hanno su questa proteina, conoscenze che potrebbero avere grandissimi risvolti pratici data la centralità dell'enzima nel metabolismo cellulare. A tal fine, per i motivi discussi e illustrati nel **paragrafo 1.8**, l'oggetto di questo studio è stata l'espressione eterologa e la purificazione di CLAN-B. La scelta di concentrare lo studio su CLAN-B è dovuta principalmente all'osservazione che CLAN-B, al pari della cN-II, è espressa a vari livelli in tutti i tessuti umani. Tuttavia la maggior parte degli studi riguarda l'isoforma A la cui espressione è ristretta a determinati tessuti. Nessuno studio ha mai indagato in maniera approfondita sul perché le due forme della proteina mostrino un diverso profilo di espressione e se questo implichi un diverso ruolo fisiologico. A conferma di ciò trovare in letteratura dati riguardanti la sola CLAN-B non è al momento possibile. Tenendo conto di tutto questo l'espressione eterologa e la purificazione di CLAN-B potrebbero rappresentare un punto di partenza sia per migliorare le conoscenze sulle interazioni proteiche della cN-II, sia per migliorare quelle su CLAN. Per completezza dello studio sono stati anche condotti esperimenti sull'espressione eterologa di CLAN-A.

2 Materiali e Metodi

2.1 Materiali

Cloruro di Guanidinio, Lisozima, Ampicillina, β -Mercaptoetanolo, Imidazolo, NaH_2PO_4 , IPTG (Isopropil- β -D-1-tiogalattopiranoside), Cloruro di Calcio, Terreno Luria Broth e Luria Agar sono stati acquistati dalla **Sigma Aldrich, St. Louis MO. USA.**

Temed, Ammonio Persolfato, Acrilammide e bis-Acrilammide, Reattivo di Bradford, Agarosio sono stati acquistati dalla ditta **BioRad.**

SDS e HCl sono stati acquistati dalla **BDH Chemicals.**

I primers sono stati acquistati dalla ditta **Bio-Fab.**

Il plasmide EX-T3678-pB01-CLAN-A è stato acquistato dalla ditta **Genecopoeia.**

Resina Ni-NTA agarosio è stata acquistata presso la ditta **Qiagen S.p.A.**

Tris base 1M, NaCl, Urea, Glicerolo sono stati acquistati dalla **J.T. Baker.**

Enzima di restrizione NoT I e Cutsmart Buffer sono stati acquistati dalla **New England BioLab.**

Kit di purificazione dei plasmidi e di estrazione da gel, enzima di restrizione Xba I e relativo tampone, DNA polimerasi PFU e relativo tampone sono stati forniti dalla ditta **Promega.**

Enzima T4 DNA Ligasi e relativo tampone sono stati forniti dalla **Fermentas.**

Il ceppo batterico *E.Coli Rosetta* è una gentile concessione del Professor Pelosi Paolo, Dipartimento di Biologia delle Piante Agrarie, Università di Pisa.

Tutte le soluzioni sono state preparate con acqua di assoluta purezza, ottenuta con il sistema **Millipore, acqua Milli Q**. Qualsiasi altro reagente utilizzato è della più alta qualità e purezza.

2.2 Preparazione plasmide CLAN-B

CLAN-A e CLAN-B differiscono per il solo dominio NACHT che è presente nella prima forma ma assente nella seconda (vedi **paragrafo 1.8** per approfondimenti). Tenendo conto di questa differenza, il plasmide contenente il cDNA di CLAN-B è stato ottenuto modificando un plasmide codificante per CLAN-A. La procedura di modifica utilizzata è stata elaborata basandosi sulla tecnica sviluppata e descritta da Karin L.H. e Pease L.R. (Karin L.H., & Pease L.R., 2007). La struttura del plasmide sul quale sono state effettuate le modifiche (EX-T3678-pB01-CLANA) è riportata in *figura 10*. Il primo passo nella procedura di modifica del plasmide è stata l'amplificazione mediante due distinte reazioni di PCR dei due frammenti fiancheggiati il dominio NACHT. Le sequenze e le caratteristiche dei primers sono riportate nella *tabella 1*.

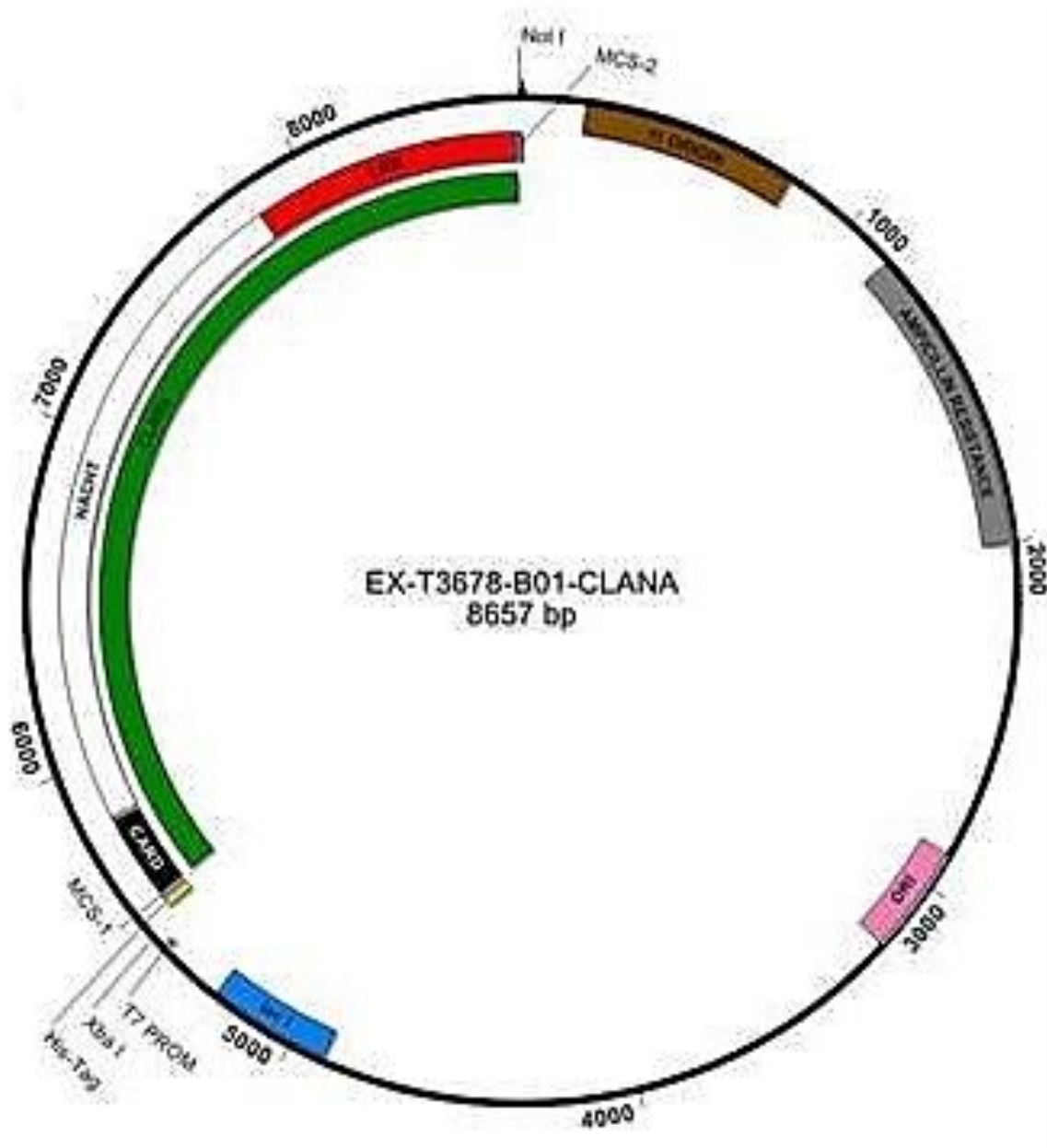


Figura 10 Struttura schematica del plasmide E-T3678- pB01-CLANA sul quale sono state effettuate le procedure di modifica.

Nome Primer	Sequenza
FW_PCR_1	5' - TAATACGACTCACTATAGGG – 3'
RV_PCR_1	5' - AGTCAGACCACTTTGTCCATTCAA GTCC – 3'
FW_PCR_2	5' - GGAC AAAGTGGTCTGACTGACAGCTT – 3'
RV_PCR_2	5' - GTT GCGGCCGC ACTCGAGCTAAGCA – 3'

Tabella 1. Sono riportati nomi e sequenze dei primers usati nelle reazioni di PCR. I primers FW_PCR_1 e RV_PCR_1 sono usati nell'amplificazione del frammento da 400 bps; i primers FW_PCR_2 e RV_PCR_2 sono stati usati nell'amplificazione del frammento da 800 bps. In giallo è indicata la zona di sovrapposizione; in verde il sito di taglio per Not I

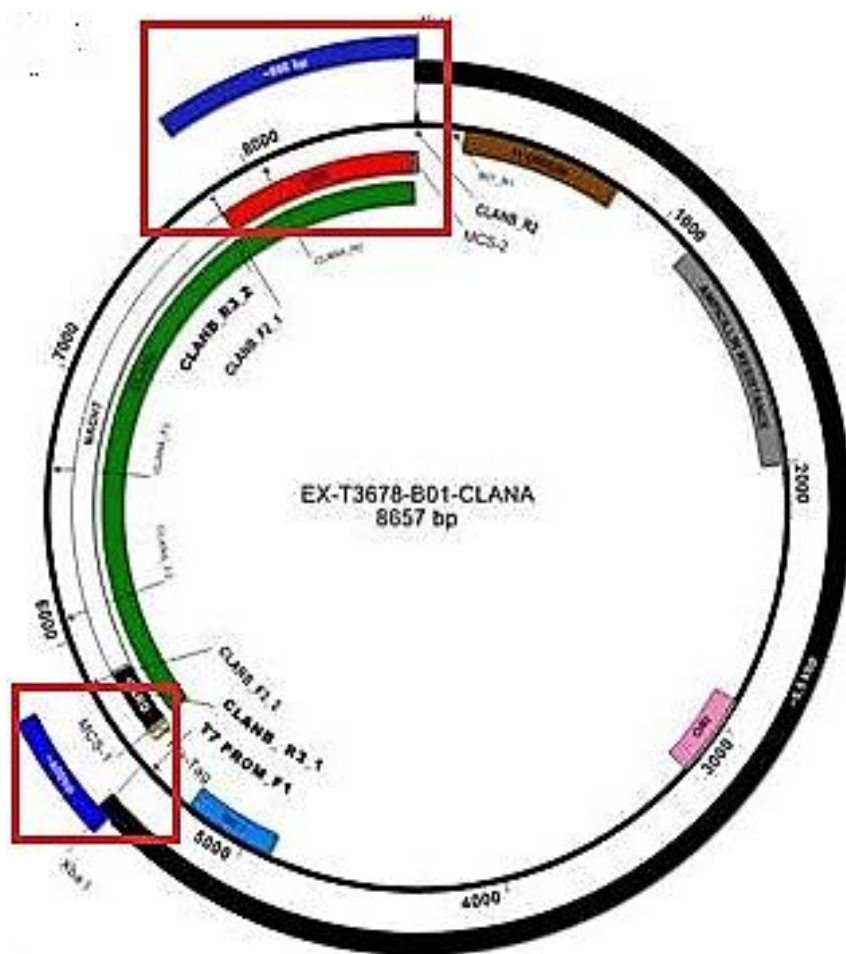


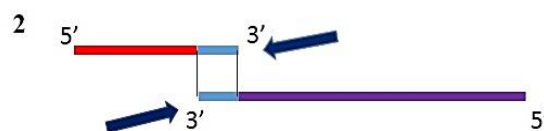
Figura 11. Sono riportate le posizioni dei frammenti amplificati all'interno del plasmide EX-T3678-CLANA

Le miscele di reazione contenevano 5 ng di DNA stampo, 1 UE di PFU polimerasi, 0,8 mM di dNTPs e 400 nM di ciascun primers in un volume finale di 15µL del buffer di reazione della polimerasi. Per la prima reazione di PCR sono stati usati i primers FW_PCR_1 e RV_PCR_1; per la seconda i primers FW_PCR_2 e RV_PCR_2. Il programma di PCR utilizzato ha previsto una fase di denaturazione iniziale a 95°C per 5 minuti seguita da 30 cicli costituiti da 3 fasi: 95°C per 30'' (fase di denaturazione), 57°C per 30'' (fase di annealing), 72°C per 30'' (fase di allungamento). L'ultimo ciclo è stato seguito in entrambe le reazioni da una fase di allungamento finale a 72°C per 4 minuti. I frammenti amplificati hanno dimensioni di 400 bps (prima PCR) e 800 bps (seconda PCR) e corrispondono rispettivamente al dominio CARD e ad alcune basi a monte di questo, e al dominio LRR. I frammenti ottenuti dalle due reazioni di PCR sono stati concepiti in modo tale da presentare una piccola regione di complementarità di 4 basi (vedi *figura 12, riquadro 1*). Questa caratteristica offre la possibilità di usare i due prodotti per formare un unico frammento da 1200 bps corrispondente alla sequenza codificante per CLAN-B. Per fare ciò i prodotti delle prime due PCR sono uniti in un'unica miscela e soggetti ad una reazione di amplificazione. Il DNA stampo di questa ultima reazione, dato dall'insieme dei prodotti delle precedenti reazioni di PCR, è costituito da 2µL del prodotto da 400 bps e da 3µL del prodotto da 800 bps (concentrazioni equimolari), successivamente diluiti 100 volte. La diluizione si è resa necessaria in quanto ogni prodotto, essendo il risultato di una reazione di PCR, conterrà, seppur in bassa concentrazione, i primers usati nella rispettiva reazione, la cui presenza può creare interferenze nella successiva PCR. La diluizione abbassa il rischio che questa eventualità si verifichi.

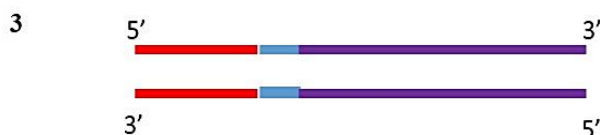
Come programma di PCR si è usato lo stesso protocollo descritto in precedenza. Durante i 5 minuti a 95°C i frammenti si denaturano e in questo modo è possibile il successivo appaiamento dei filamenti a singola elica della regione complementare di 4 basi presenti sui frammenti da 400 e 800 bps (vedi *figura 12, riquadro 2*). La DNA polimerasi agirà sintetizzando i filamenti complementari, e si avrà così a disposizione il frammento da 1200 bps corrispondente alla sequenza codificante per CLAN-B (vedi *figura 12, riquadro 3*). La presenza nella miscela di reazione dei primers FW_PCR_1 e RV_PCR_2, posti alle due estremità di questo frammento, consentirà nei successivi cicli di amplificare solamente il prodotto desiderato (vedi *figura 12, riquadro 4*). La miscela di reazione conteneva 5 ng circa di DNA stampo (diluito 1:100), 1 UE di PFU Polimerasi, 0,8 mM di dNTPs e 400 nM di ciascun primers in un volume finale di 50µL in tampone della polimerasi.



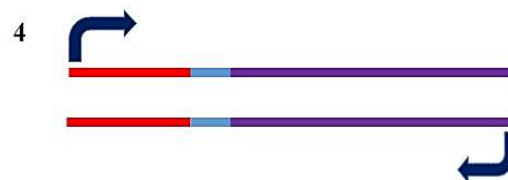
Frammenti dsDNA da 400 bps (in rosso) e 800 bps (in viola); in blu è indicata la regione di complementarità.



Dopo la denaturazione è possibile l'appaiamento tra i filamenti a singola elica della regione complementare presente sui frammenti da 400 e 800 bps. Le frecce indicano i punti in cui la DNA polimerasi agirà sintetizzando il filamento complementare.



A seguito dell'azione della DNA polimerasi si ottiene il frammento da 1200 bps corrispondente alla sequenza di CLAN-B.



La reazione di PCR serve ad amplificare il frammento ottenuto. Le frecce blu indicano posizione ed orientamento dei primers.

9

Figura 12 Schema riassuntivo della procedura usata per ottenere il frammento da 1200 bps.

A questo punto il plasmide pBO1-CLANA è stato digerito con gli enzimi di restrizione NoT I e Xba I, i cui siti di taglio fiancheggiano la regione codificante per CLAN-A. La miscela di reazione conteneva 24 UE di Xba I e 40 UE di NoT I nel Cutsmart Buffer 1X, 500 ng di DNA plasmidico, 0,5 μ L di BSA (10 μ g/ μ L) in un volume totale di 50 μ L. La reazione è stata incubata per 1 ora a 37°C. L'efficienza della digestione è stata verificata tramite elettroforesi in gel di agarosio; la banda corrispondente al plasmide privato della sequenza di CLAN-A è stata purificata dal gel con l'apposito kit fornito dalla ditta **Promega** e conservata. I siti di taglio per gli enzimi di restrizione usati precedentemente sono presenti anche nel frammento da 1200 bps; è stato quindi possibile digerire il frammento con Xba I e NoT I creando così estremità sporgenti idonee a legarsi con quelle del plasmide digerito. La miscela di reazione usata per questa digestione conteneva 24 UE di enzima Xba I e 40 UE di enzima NoT I nel Cutsmart Buffer 1X, 0,5 μ L di BSA (10 μ g/ μ L) e 40 μ L di materiale genetico in un volume finale di 54,5 μ L. La reazione è lasciata in incubazione a 37°C per 1 ora. Il prodotto della digestione è stato corso su gel di agarosio e purificato da questo con il kit fornito dalla ditta **Promega**. I frammenti digeriti sono stati poi uniti in un'unica soluzione in presenza di DNA ligasi per consentire la formazione di un nuovo plasmide portante la sequenza codificante per CLAN-B (successivamente denominato EX-T3678-pB01-CLANB); la miscela di reazione conteneva 5 UE dell'enzima nel suo tampone, 4 ng del plasmide digerito, 13 ng del frammento da 1200 bps in un volume finale di 20 μ L. La miscela è lasciata a 16°C per 1 ora, e utilizzata per trasformare un ceppo di *Escherichia Coli* (vedere **paragrafo 2.5** per dettagli sulla procedura di

trasformazione batterica). Sono stati piastrati 50 μ L su terreno LB agar più ampicillina e incubati over night a 37°C.

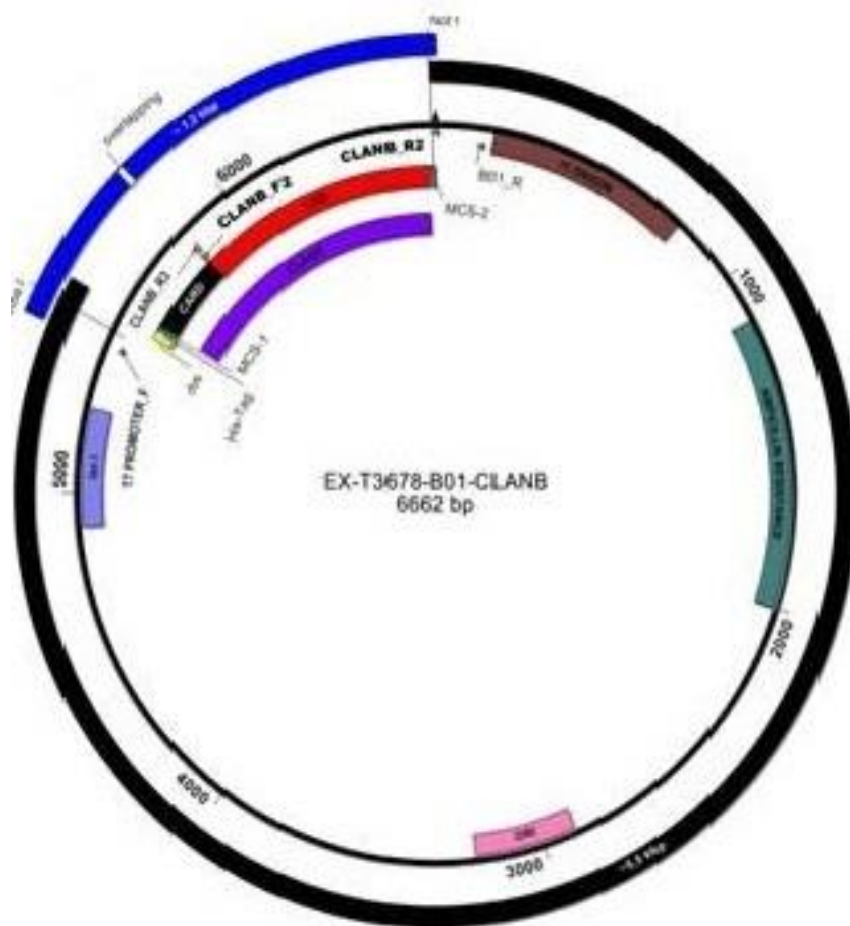


Figura 13 La figura mostra la posizione del frammento da 1200 bps e il plasmide dopo la digestione con gli enzimi di restrizione *Xba* I e *NoT* I.

È stata selezionata una colonia tra quelle sviluppatesi a seguito della trasformazione e messa a crescere in terreno LB per 24 ore a 37°C. Successivamente è stato purificato il plasmide usando l'apposito kit di purificazione fornito dalla ditta **Promega**. EX-T3678-pB01-CLANB è stato quindi soggetto a test per verificare la riuscita dell'esperimento. In primo luogo è stata effettuata una digestione con gli enzimi di restrizione *NoT* I e

Xba I, controllando poi con elettroforesi in gel di agarosio la presenza di frammenti delle dimensioni previste. La miscela di reazione conteneva 20 UE NoT I e 12 UE di Xba I nel Cutsmart Buffer 1X, 0,2 µL di BSA (10µg\µL) e 20 ng di materiale plasmidico in un volume finale di 20 µL. La miscela è stata incubata a 37°C per 1 ora e 30 minuti. Successivamente il plasmide è stato inviato ai laboratori della ditta **Bio-Fab** per essere sequenziato. Tutte le reazioni di PCR e tutte le digestioni con enzimi di restrizione descritte sono state confermate con elettroforesi in gel di agarosio in presenza di bromuro di etidio (EtBr).

2.3 Elettroforesi su gel di Agarosio

La preparazione di gel allo 0,7% di agarosio è stata eseguita secondo i protocolli standard. Le corse elettroforetiche sono servite a verificare la buona riuscita delle reazioni di PCR e dei trattamenti con enzimi di restrizione, mediante il confronto tra le bande del campione e quelle di standard di dsDNA. La rilevazione delle bande di DNA è resa possibile grazie alla presenza nel gel di bromuro di etidio (EtBr) allo 0,05%, agente intercalante in grado di emettere fluorescenza quando esposto a raggi ultravioletti.

2.4 Preparazione cellule competenti

Per la preparazione di cellule competenti è stato usato il metodo del Calcio-Cloruro (CaCl₂). Cellule di *Escherichia Coli* del ceppo *Rosetta* sono lasciate crescere a 37°C in agitazione in 20 mL di terreno LB. La crescita batterica è stata monitorata ad intervalli regolari misurando il livello di assorbanza a 600 nm; quando è stato raggiunto il valore di 0,4 unità di assorbanza la

coltura batterica è stata raffreddata in ghiaccio per 10 minuti e successivamente centrifugata a 3000g per 15 minuti a 4°C. Il pellet è stato sospeso in 1,8 mL di CaCl₂ 100 mM e lasciato in ghiaccio per 10 minuti. La soluzione è stata nuovamente centrifugata a 3000g per 15 minuti a 4°C e il pellet sospeso in ghiaccio in 0,4 mL di CaCl₂ 100mM addizionati con glicerolo 15% (v\v). Le cellule sono state poi divise in aliquote da 50 µL ciascuna e conservate a -80°C.

2.5 Trasformazione Batterica

Batteri del ceppo *E.Coli Rosetta* resi competenti con il metodo del calcio-cloruro (CaCl₂) e conservati a -80°C (**paragrafo 2.4** per dettagli), sono stati scongelati in ghiaccio per non esporre le cellule a bruschi cambi di temperatura che potrebbero avere effetti negativi sulla vitalità cellulare. Quando completamente scongelati, ai batteri sono stati aggiunti 200 ng del plasmide e successivamente sottoposti a shock termico mediante trasferimento per 40 secondi in un bagno termico a 42°C e immediato trasferimento in ghiaccio per 1 minuto. Dopo lo shock termico alla coltura batterica è stato aggiunto 1 mL di LB e messa in crescita per 1 ora a 37°C; successivamente sono stati piastrati 50 µL. La piastra conteneva un terreno completo Agar-Luria addizionato con ampicillina in una concentrazione di 50 µg/mL; dato che il plasmide utilizzato contiene il gene che conferisce resistenza all'antibiotico in questione, l'aggiunta di ampicillina assicura che potranno svilupparsi solo colonie derivanti da batteri che contengono il plasmide. Dopo 24 ore di crescita a 37°C è stato possibile osservare un elevato numero di colonie, indice della buona riuscita della trasformazione batterica.

2.6 Induzione dell'espressione e preparazione dell'estratto grezzo

Una aliquota di cellule batteriche è stata messa a crescere in 6 mL di terreno LB addizionato con ampicillina a 37 °C in agitazione; la crescita è stata monitorata a intervalli regolari misurando l'assorbanza a 600 nm. Quando il valore dell'assorbanza ha raggiunto 0,6 unità di assorbanza, aliquote da 600µL di coltura batterica sono state prelevate e addizionate con l'IPTG (Isopropil-β-D-1-tiogalattopiranoside) a concentrazione crescente (0,25 mM, 0,50 mM e 1mM). L'IPTG è in grado di indurre l'espressione della CLAN-B, in quanto nel plasmide l'espressione della proteina è sotto il controllo del promotore batterico Lac, che è inducibile dal lattosio, di cui l'IPTG è un analogo. Le cellule sono state lasciate crescere per 24 ore a 28°C. Per avere conferma dell'avvenuta espressione della proteina, la coltura è stata centrifugata e il pellet, contenente le cellule, è stato risospeso in 4 mL buffer di lisi (50 mM TRIS-HCl, 300 mM NaCl, 10 mM imidazolo, pH8). Sono state prelevate delle aliquote da 10 µL, addizionate a 20 µl di buffer SDS/β-mercaptoetanolio 1:20, bollite per 5 minuti e usate per una corsa elettroforetica SDS\PAGE. Dall'elettroforesi si è evidenziata una banda marcata del peso molecolare corrispondente a CLAN-B (40 KDa circa), confermando dunque che i batteri hanno correttamente espresso la proteina.

Si è poi proceduto alla preparazione dell'estratto grezzo da usare per la purificazione di CLAN-B. Un aliquota di cellule di *E.Coli Rosetta* è messa a crescere in 6 mL di terreno Luria Broth addizionato con ampicillina a 37°C in agitazione overnight. Il mattino la crescita batterica è valutata tramite misurazione a 600 nm dell'assorbanza. Si registra il valore e la coltura

batterica è diluita fino a raggiungere le 0,1 unità di assorbanza. La coltura batterica così diluita è messa di nuovo a crescere in LB addizionato con ampicillina a 37°C in agitazione. Raggiunte le 0,6 unità di assorbanza è stato aggiunto IPTG 1mM e la coltura è stata lasciata crescere per 24 ore alla temperatura di 20°C. La temperatura di crescita è stata abbassata per favorire il corretto ripiegamento della proteina. Il terreno di coltura è stato poi centrifugato a 1000 g per 15 minuti a 4°C. Il pellet è stato risospeso in 4mL di tampone TRIS HCl 50mM, 300 mM NaCl pH 7,4 al quale è stato aggiunto 1 mg/mL di lisozima e lasciato in agitazione in ghiaccio per 30 minuti. Le cellule sono state poi soggette a 10 cicli di trattamento con ultrasuoni da 30 secondi ciascuno, con un intervallo di 30 secondi tra un ciclo e l'altro, tenendo il tutto in ghiaccio per evitare che gli ultrasuoni potessero riscaldare troppo il campione denaturando le proteine. Il lisato è stato infine centrifugato a 10000 g per 30 minuti a 4°C affinché le cellule non rotte e grossi frammenti di membrane potessero precipitare e nel sovranatante (estratto grezzo) rimanessero tutte le proteine solubili.

2.7 Purificazione di CLAN-B

Sono state testate tre diverse metodiche di purificazione, di cui una operante in condizioni denaturanti e due in condizioni native, per poter individuare la migliore per la proteina in questione. I tre metodi hanno in comune l'utilizzo di una resina per affinità Ni-NTA Agarosio che possiede ioni Nichel (Ni^{2+}) i quali, interagendo con le cariche negative della coda di istidine appositamente inserita nella sequenza di CLAN, causano adsorbimento della proteina, rendendo possibile il processo di purificazione. Per eluire la proteina in condizioni native è stato utilizzato l'imidazolo.

Si tratta di una molecola strutturalmente simile all'istidina e che si rivela essere un eccellente competitore di questa per il legame alla resina. L'uso di un tampone contenente imidazolo a bassa concentrazione durante il lavaggio della resina ha permesso la rimozione delle proteine blandamente legate, mentre l'utilizzo di un tampone ad alta concentrazione di imidazolo ha consentito l'eluizione della proteina di interesse. Nella metodica operante in condizioni denaturanti l'eluizione è avvenuta modificando il grado di ionizzazione della His-Tag. Infatti per poter interagire con gli ioni Ni^{2+} della resina le istidine devono essere deprotonate; ne segue che se protonate le istidine non possono legarsi alla resina. L'uso di tampone ad acidità crescente ha quindi permesso di variare il grado di ionizzazione della coda di istidine consentendo l'eluizione della proteina quando richiesto.

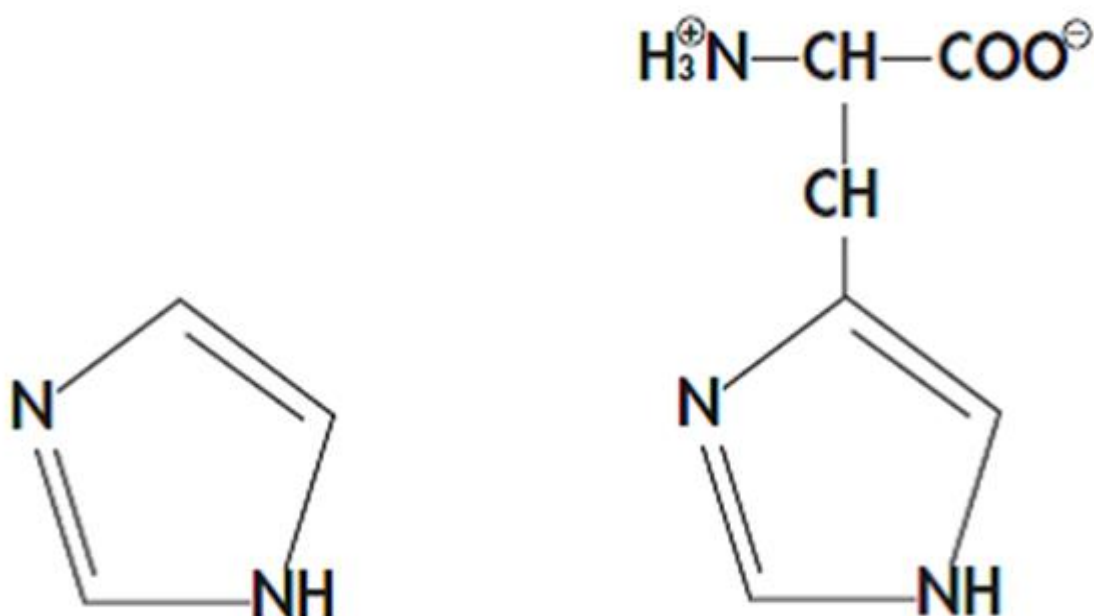


Figura 14 Struttura chimica di imidazolo (sulla sinistra) e istidina (sulla destra)

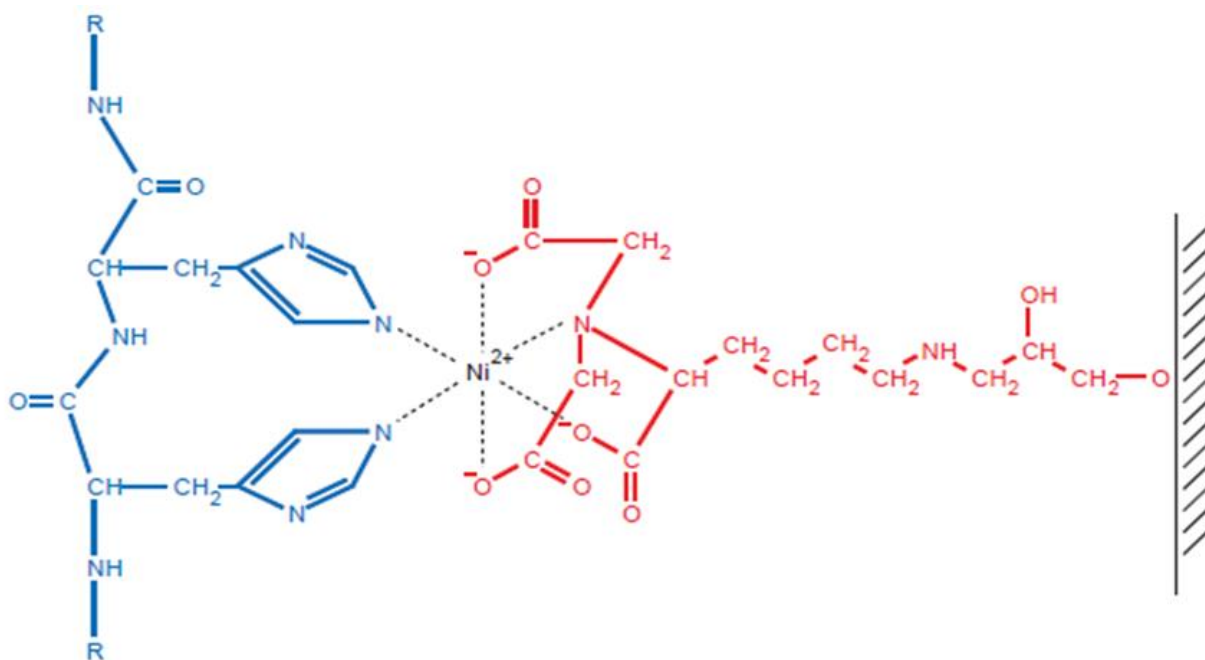


Figura 15 Schema dell'interazione tra due residui consecutivi di istidina nella His-Tag e la resina.

Sono di seguito riportati i dettagli tecnici dei protocolli seguiti.

Metodo I: 1mL di estratto grezzo è lasciato in agitazione blanda in ghiaccio per 1 ora con 1mL di resina Perfect Pro Ni-NTA Agarosio. Il tutto è stato poi trasferito in provetta graduata e lasciato decantare; il sovrinatante è stato rimosso e conservato; la resina è stata lavata con 1mL di tampone di lavaggio WASH 1 (50mM TRIS-HCl, 300mM NaCl, 20mM imidazolo pH 8), in modo tale da rimuovere sia le proteine non legate alla resina che quelle legate blandamente. CLAN-B è stata eluita con 0,4 mL di tampone 50mM TRIS-HCl, 300mM NaCl, 250mM imidazolo pH 8 (elution buffer). Dopo ogni lavaggio il sovrinatante è stato rimosso e conservato per la corsa elettroforetica.

Metodo II: 1mL di estratto grezzo diluito 1:10 in tampone TRIS-HCl 50mM, 300 mM NaCl, pH 7,4 è lasciato in agitazione blanda in ghiaccio per 1 ora

con 1mL di resina Perfect Pro Ni-NTA Agarosio. Il tutto è stato poi trasferito in provetta graduata e lasciato decantare; il sovranatante è stato rimosso e conservato, mentre la resina è stata lavata con 1mL di buffer di lavaggio WASH 1 (50mM TRIS-HCl, 300mM NaCl, 20mM imidazolo pH 8); la proteina è stata poi eluita con 1 lavaggio di 0,4 mL di apposito buffer (50mM TRIS-HCl, 300mM NaCl, 250mM imidazolo pH 8). Dopo ogni lavaggio il sovrinatante è rimosso e conservato per la corsa elettroforetica.

Metodo III: a 2mL di estratto grezzo sono addizionati 1,14 g di Cloruro di Guanidinio e la soluzione portata a pH 8 mediante TRIS base 1M. L'estratto è lasciato in agitazione in ghiaccio per 35 minuti poi è stato aggiunto 1mL di resina Perfect Pro Ni-NTA Agarosio lasciata in agitazione a freddo per 1 ora. Dopo il trasferimento in provetta graduata e la decantazione, il sovrinatante è raccolto e conservato mentre la resina è lavata con una serie di buffer ad acidità crescente. Nel dettaglio sono stati eseguiti: 2 lavaggi da 2mL con Buffer C (100mM NaH₂PO₄, 8M Urea pH 6,3), 4 lavaggi da 0,2mL con Buffer D (100mM NaH₂PO₄, 8M Urea pH 5,9), 4 lavaggi da 0,2mL con Buffer E (100mM NaH₂PO₄, 8M Urea pH 4,5). Ad ogni lavaggio il sovrinatante è recuperato e conservato per la corsa elettroforetica. Questo protocollo è stato creato modificando un protocollo già esistente ideato dalla ditta **Qiagen** per la purificazione di proteine ricombinanti provviste di His-Tag. In accordo con il protocollo **Qiagen**, l'eluizione della proteina avviene a seguito dei lavaggi con Buffer D, per la forma monomerica, o a seguito dei lavaggi con Buffer E per i multimeri e gli aggregati.

Metodica	Condizioni	Buffer Utilizzati	Procedura
Metodo I	Native	Wash 1 (50mM TRIS-HCl, 300mM NaCl, 20mM imidazolo pH 8) Buffer Eluizione (50mM TRIS-HCl, 300mM NaCl, 250mM imidazolo pH 8)	1 lavaggio con Buffer Wash 1; eluizione con Buffer Eluizione
Metodo II	Native	Wash 1 (50mM TRIS-HCl, 300mM NaCl, 20mM imidazolo pH 8) Buffer Eluizione (50mM TRIS-HCl, 300mM NaCl, 250mM imidazolo pH 8)	Estratto grezzo diluito 1:10; 1 lavaggio con Buffer Wash 1; eluizione con Buffer Eluizione
Metodo III	Denaturanti	Buffer C (100mM NaH ₂ PO ₄ , 8M Urea pH 6,3) Buffer D (100mM NaH ₂ PO ₄ , 8M Urea pH 5,9) Buffer E (100 mM NaH ₂ PO ₄ , 8M Urea pH 4,5)	Estratto grezzo addizionato con cloruro di guanidinio; 2 lavaggi con Buffer C; 4 lavaggi con Buffer D; 4 lavaggi con Buffer E

Tabella 3. Metodiche di purificazione testate per CLAN-B.

2.8 Determinazione della concentrazione proteica

La concentrazione proteica è stata valutata secondo il saggio di Bradford (Bradford M.M., 1976). Il saggio prevede l'uso di una soluzione contenente etanolo al 4.7%, acido fosforico all'8.5% e Blue di Coomassie un colorante in grado di legarsi in maniera specifica ai residui basici delle proteine. La concentrazione proteica è calcolata misurando l'assorbanza a 595 nm e avvalendosi di una retta di taratura che usa l'albumina di siero bovino come standard. Sono stati preparati almeno tre campioni della soluzione a concentrazione incognita, per stimare la quantità di proteina come media aritmetica dei tre valori. La procedura è stata eseguita per poter caricare una precisa quantità in µg di proteine nell'elettroforesi.

2.9 Elettroforesi SDS-Page

La preparazione dei gel al 10% di acrilammide è stata effettuata seguendo i protocolli standard; la corsa elettroforetica è stata eseguita con un intensità costante di 20mA ed è servita, mediante il confronto tra le bande dei campioni e quelle degli standard proteici, a verificare la corretta purificazione della proteina.

2.9.1 Espressione di CLAN-A

L'espressione di CLAN-A è stata testata tre diversi ceppi batterici (*E.Coli Rosetta*, *E.Coli p-Lease*, *E.Coli BL-21*). Il plasmide utilizzato è il plasmide EX-T3678-pB01-CLANA, lo stesso plasmide descritto nel **paragrafo 2.2**. La trasformazione batterica e l'induzione dell'espressione della proteina sono state eseguite secondo i protocolli descritti rispettivamente nel **paragrafo 2.5** e nel **paragrafo 2.6**.

3 Risultati e Discussione

3.1 Modifica del Plasmide

Il plasmide pB01-CLANB è stato ottenuto rimuovendo la sequenza codificante per CLAN-A dal plasmide EX-T3678-pB01-CLANA e sostituendola con quella codificante per CLAN-B. La procedura ha previsto una serie di reazioni di PCR e digestioni con enzimi di restrizione, la bontà dei risultati è stata verificata tramite elettroforesi in gel di agarosio. La prima fase della procedura è stata l'amplificazione con due reazioni di PCR distinte dei frammenti fiancheggianti il dominio NACHT. Si tratta di frammenti corrispondenti grosso modo al dominio CARD e al dominio LRR delle dimensioni rispettivamente di 400 bps e 800 bps. I due frammenti ottenuti sono stati poi uniti e amplificati nuovamente a formare un unico frammento di 1200 bps circa, secondo la procedura descritta in dettaglio nel **paragrafo 2.2**. I risultati di questa prima fase sono illustrati in *figura 16*. Dall'osservazione del gel emerge chiaramente la presenza in ogni campione di una sola banda delle dimensioni attese, confermando quindi la buona riuscita delle reazioni di PCR. Il secondo passaggio è consistito nella digestione sia del plasmide codificante per CLAN-A sia del frammento da 1200 bps corrispondente alla sequenza codificante per CLAN-B. Sono stati usati gli enzimi di restrizione Not I e Xba I; i risultati del gel di elettroforesi sono illustrati in *figura 17*.

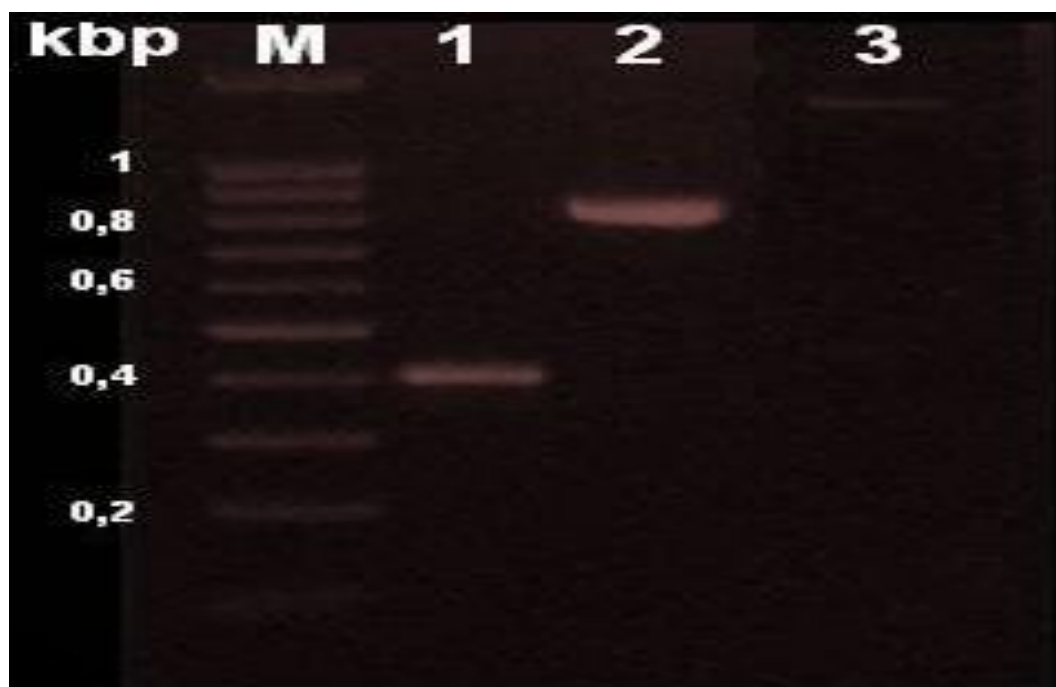


Figura 16 Risultati delle prime tre reazioni di PCR. I campioni da sinistra verso destra: standard (M), frammento da 400 bps (1); frammento da 800 bps (2); frammento da 1200 bps (3).



Figura 17 Risultati della digestione del plasmide pB01-CLANA e del frammento da 1200 bps. I campioni da sinistra verso destra: standard proteici; digestione del frammento da 1200 bps (4,5,6); digestione del plasmide pB01-CLANA (7,8,9).

bontà anche di questa digestione. Al termine della procedura di modifica del plasmide è stato eseguito un test per verificare che si fosse effettivamente formato il plasmide codificante per CLAN-B richiesto. Infatti non vi è la certezza che il plasmide si sia correttamente formato; uno dei rischi è che il plasmide si richiuda senza aver legato il frammento da 1200 bps. In una eventualità di questo tipo il plasmide sarebbe in grado di trasformare le cellule batteriche, ma queste si rivelerebbero poi incapaci di produrre CLAN-B. Per controllo il plasmide è stato digerito con gli stessi enzimi di restrizione usati in precedenza. Se la procedura di modifica è stata ben eseguita il risultato della digestione saranno due frammenti dalle dimensioni di circa 1200 bps e di circa 5000 bps corrispondenti rispettivamente a CLAN-B e al resto del plasmide; risultati diversi indicheranno un errore nell'ultimo passo della procedura di modifica.

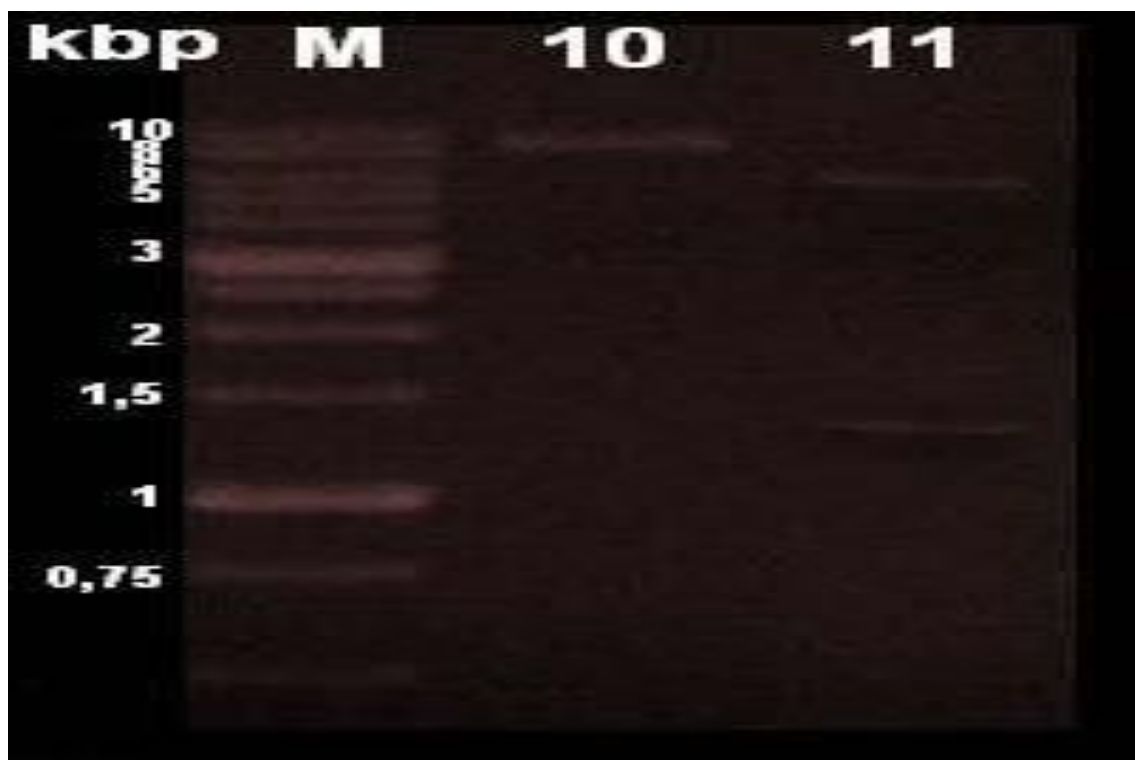


Figura 19 Risultati della digestione del plasmide pB01-CLANB. I campioni da sinistra verso destra: standard; plasmide pB01-CLANB non digerito; plasmide pB01-CLANB digerito con Xba e Not I.

Dall'analisi del gel è stato possibile riscontrare la presenza di due bande delle dimensioni richieste; si può dunque concludere che il plasmide pB01-CLANA è stato correttamente modificato e che si ha effettivamente a disposizione il plasmide codificante per CLAN-B. Per un'ulteriore conferma, dopo questo test il plasmide è stato sequenziato dai laboratori della ditta **Bio-Fab** (dati non riportati). Come da attese il sequenziamento ha confermato la riuscita delle procedure di modifica del plasmide.

3.2 Espressione CLAN-B

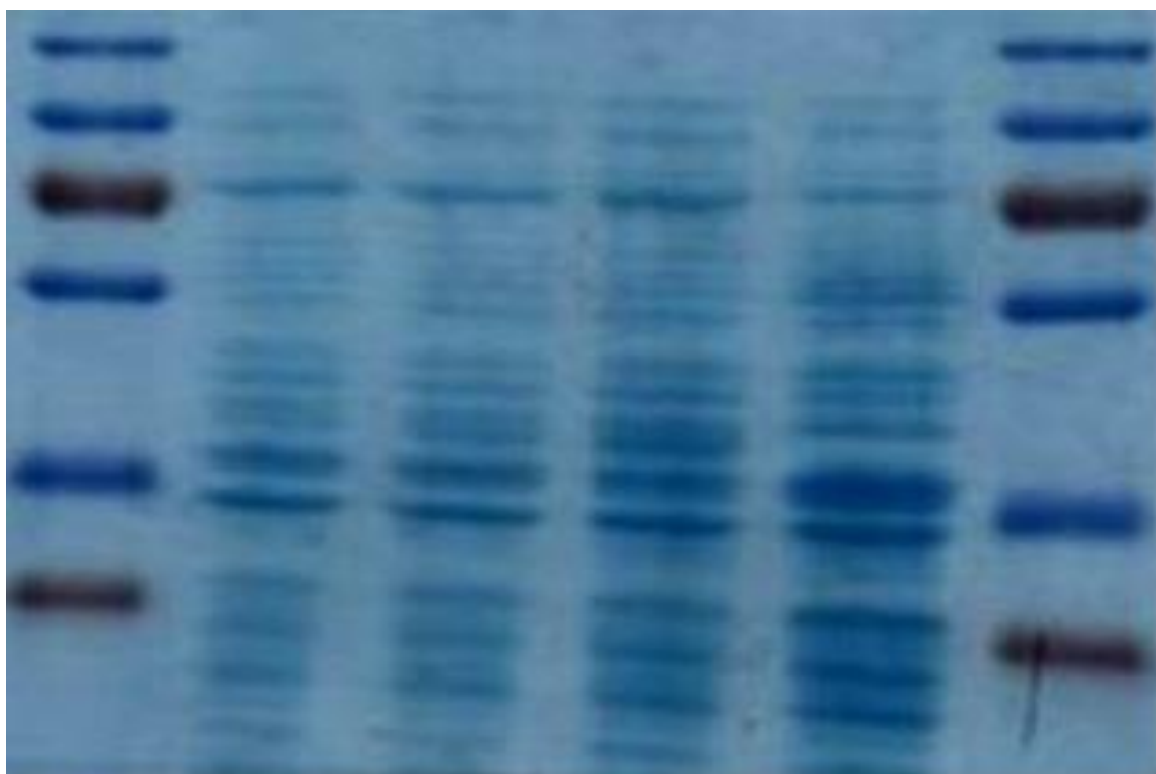


Figura 20 Elettroforesi dell'espressione di CLAN-B. I campioni da sinistra verso destra: standard proteici, estratto grezzo di E.Coli Rosetta senza IPTG, estratto grezzo con 0,25 mM IPTG, estratto grezzo con 0,5 mM IPTG, estratto grezzo con 1 mM IPTG.

L'espressione di CLAN-B è stata indotta in cellule di *E.Coli Rosetta* tramite l'aggiunta di IPTG alla coltura batterica (per dettagli vedere **paragrafo 2.6**). L'IPTG in questo caso è utilizzato come induttore dell'espressione, in grado

di stimolare la trascrizione della sola CLAN-B. Sono stati effettuati test con concentrazioni crescenti di IPTG (0,25 mM, 0,50 mM e 1 mM). Il risultato atteso da questo esperimento era la presenza di una banda del Peso Molecolare corrispondente a CLAN-B sempre più marcata all'aumentare della concentrazione di IPTG somministrata alla coltura. Come si evince dalla *figura 20* i risultati sono in linea con le attese ed è facilmente riscontrabile la presenza di una banda corrispondente a CLAN-B che diventa sempre più marcata all'aumentare della concentrazione di IPTG. Il risultato conferma quindi l'avvenuta espressione eterologa della proteina.

3.3 Purificazione CLAN-B

Sono state testate tre metodiche per la purificazione della proteina. I tre metodi si differenziano per le condizioni in cui operano (native o denaturanti) mentre sono accumulati dall'utilizzo di una resina Ni-NTA Agarosio contenente ioni Ni^{2+} ; questi interagendo con la coda di istidine della proteina ricombinante ne causano l'adsorbimento rendendo così possibile la purificazione (per ulteriori dettagli vedere **paragrafo 2.7**).

Il primo metodo testato prevedeva un lavaggio in condizioni native per la rimozione delle proteine non legate, seguito dall'eluizione della proteina ricombinante con un buffer contenente 250 mM di imidazolo. L'imidazolo è in grado di competere con i residui di istidina della His-Tag per il legame agli ioni Ni^{2+} , causando di fatto il distacco della proteina dalla resina.

La concentrazione di 250 mM è sufficientemente alta da consentire l'eluizione di tutta la proteina legata. I risultati sono riportati in *figura 21*.

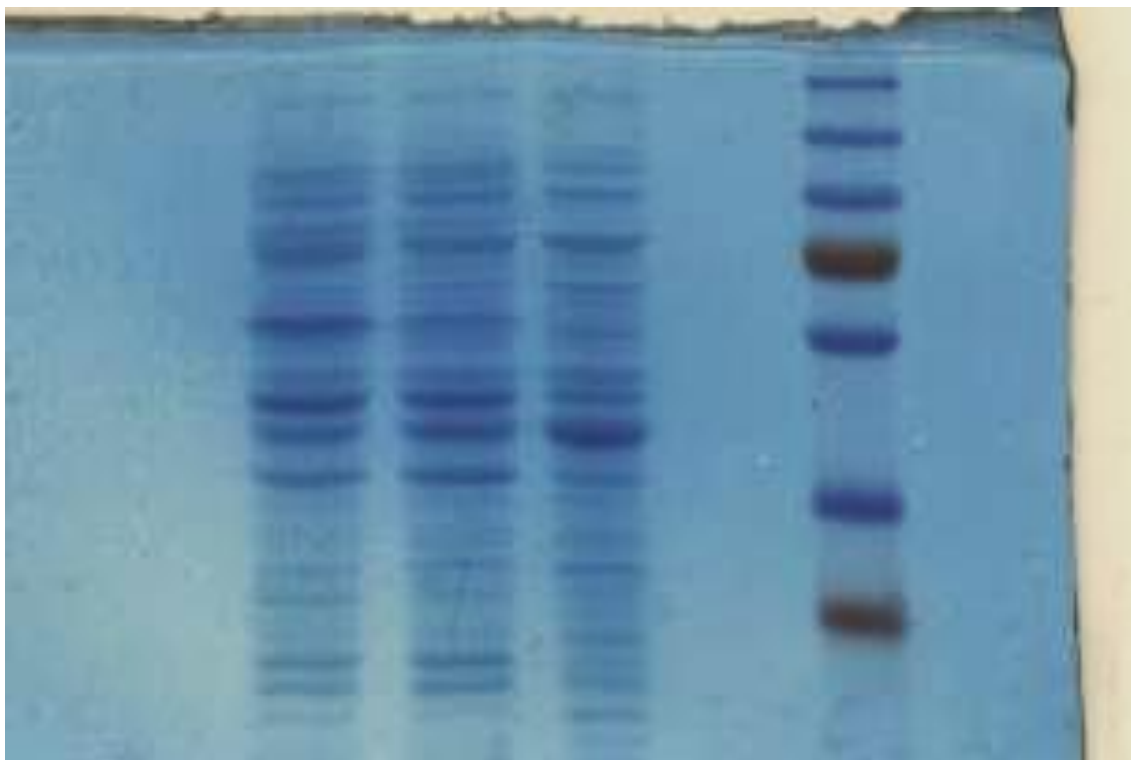


Figura 21 Elettroforesi del primo metodo di purificazione di CLAN-B. I campioni da sinistra verso destra: non legato, Wash1, eluizione, standard proteici.

La presenza della banda corrispondente a CLAN-B è stata riscontrata in tutti e tre i campioni, indicando una mancata purificazione di quest'ultima. La banda è sì presente nel campione dell'eluizione, ma anche nel non legato e nel lavaggio, dove non dovrebbe essere presente. I risultati hanno quindi messo in evidenza una difficoltà da parte della resina di interagire in maniera opportuna con la proteina: l'interazione tra gli ioni Ni^{2+} della resina e la coda di istidine può avvenire ma non è abbastanza forte da consentire una buona purificazione di CLAN-B.

Il protocollo seguito nel secondo metodo nasce da una modifica apportata al protocollo del primo, diluendo inizialmente l'estratto grezzo di un fattore 10

in un tampone TRIS-HCl 50mM, 300 mM NaCl, pH 7,4. La diluizione dell'estratto grezzo è stata effettuata in modo tale da abbassare la concentrazione proteica, dal momento che una concentrazione troppo elevata potrebbe interferire con il processo di purificazione, rendendo meno efficace l'azione della resina. I risultati sono illustrati in *figura 22*.

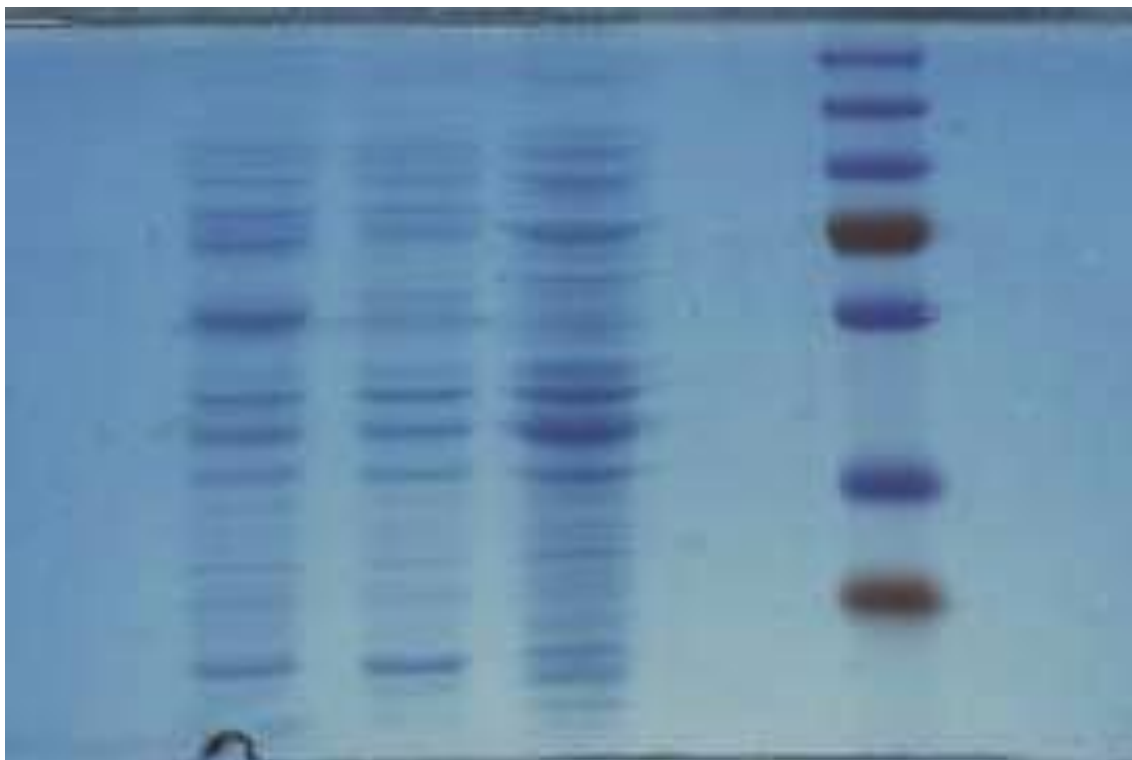


Figura 22 Elettroforesi del secondo metodo di purificazione di CLAN-B. I campioni da sinistra verso destra: non legato, lavaggio, eluizione, standard proteici.

Come nel caso precedente i risultati evidenziano la presenza di una banda di peso molecolare corrispondente a quello di CLAN-B in tutti e tre i campioni. Le considerazioni fatte per i risultati ottenuti dal primo metodo sono valide anche per questo risultato. Si può quindi dedurre che le metodiche di purificazione operanti in condizioni native non sono applicabili alla proteina di nostro interesse.

Il terzo metodo di purificazione opera in condizioni denaturanti (per dettagli vedere **paragrafo 2.7**). La scelta di operare in tali condizioni è stata presa a seguito dei risultati delle prime due metodiche che hanno messo in evidenza un'incapacità della proteina di interagire con la resina. Questo evento può essere imputato al ripiegamento proteico di CLAN che renderebbe la coda di istidine inaccessibile all'ambiente esterno, impedendo di fatto l'interazione tra questa e gli ioni Ni^{2+} della resina; una situazione simile potrebbe anche essere causata dalla formazione di aggregati o multimeri. In condizioni denaturanti la coda di istidine dovrebbe essere completamente esposta, così che possa migliorare l'interazione con la resina e quindi l'efficacia di purificazione. Le condizioni denaturanti sono state ottenute aggiungendo all'estratto grezzo Cloruro di Guanidinio e successivamente mantenute usando buffer contenenti Urea 8M. L'eluizione della proteina è stata invece ottenuta agendo sul grado di ionizzazione della coda di istidine. I residui di istidina della coda devono essere deprotonati per potersi legare agli ioni Ni^{2+} ; da ciò si deduce che se protonate le istidine perdono la capacità di interagire con la resina. L'utilizzo di buffer ad acidità crescente ha permesso di variare il grado di ionizzazione della His-Tag in modo tale da consentire l'eluizione della proteina solamente con il penultimo lavaggio (per la forma monomerica) e con l'ultimo lavaggio (per aggregati e multimeri). I risultati sono riportati in *figura 23*.

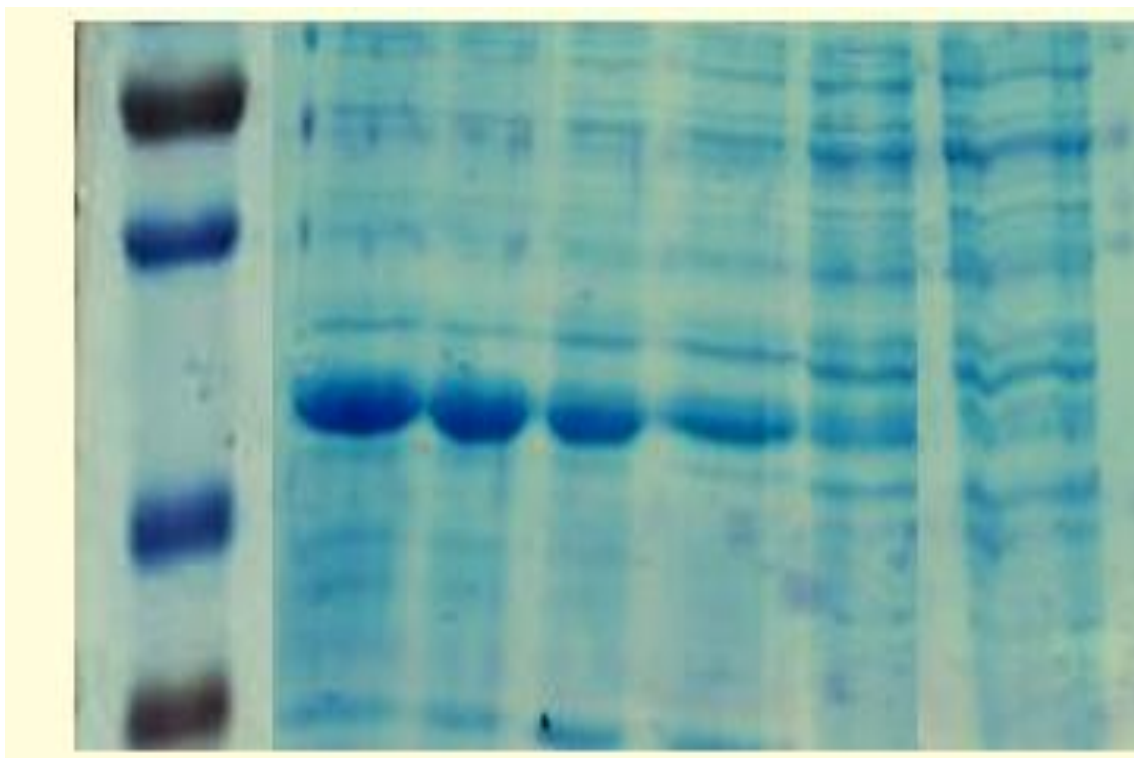


Figura 21 Elettroforesi del terzo metodo di purificazione di CLAN-B. I campioni da sinistra verso destra: standard proteici, 3° e 4° lavaggio buffer E, 1° e 2° lavaggio buffer E, 3° e 4° lavaggio buffer D, 1° e 2° lavaggio buffer D, lavaggio buffer C, non legato.

I risultati ottenuti sono pienamente soddisfacenti e in linea con le attese. La banda di CLAN-B è infatti assente nel campione non legato e nel lavaggio con buffer C, mentre è presente nei lavaggi di eluizione. Nel suo complesso l'esperimento indica che il protocollo elaborato è quello idoneo a purificare la proteina. In condizioni denaturanti la proteina può legarsi alla resina, come testimonia la sua assenza nei campioni non legato e buffer C, ed essere correttamente eluita variando il grado di ionizzazione della His-Tag. Inoltre data la presenza della proteina sia nel lavaggio di eluizione dei monomeri, che in quello di aggregati e multimeri, si può affermare che, almeno in queste condizioni, CLAN-B esiste sia come monomero che come multimero.

3.4 Espressione di CLAN-A

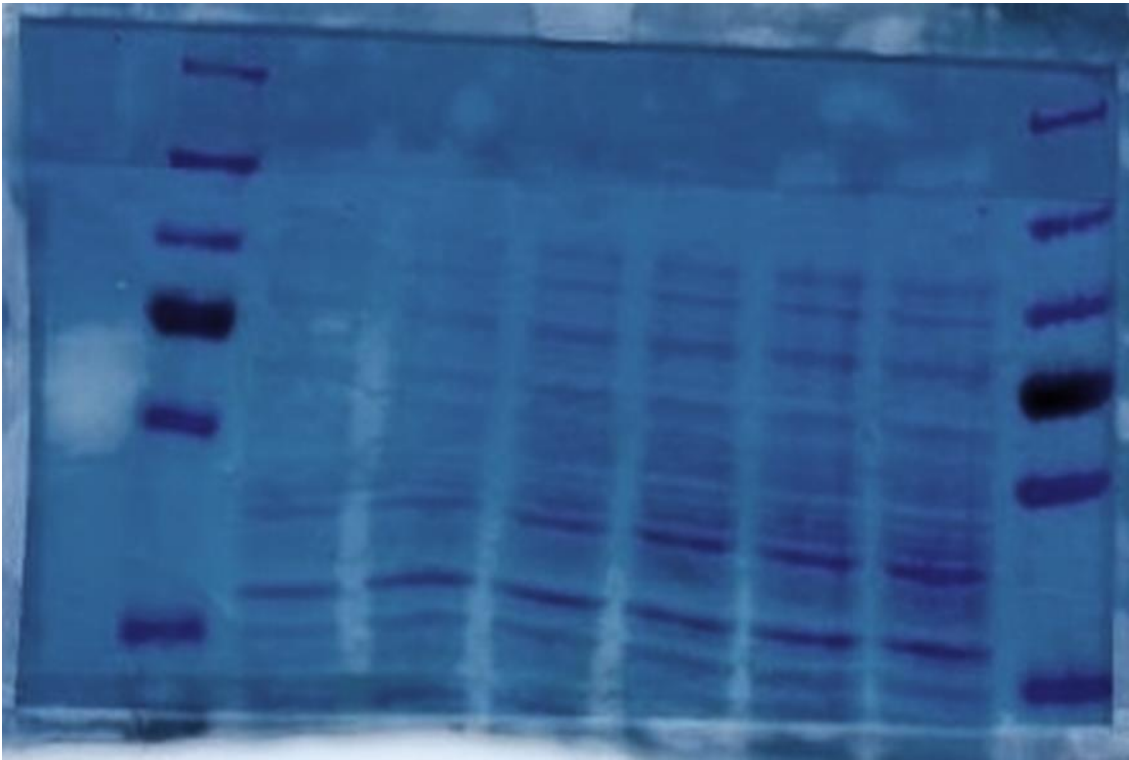
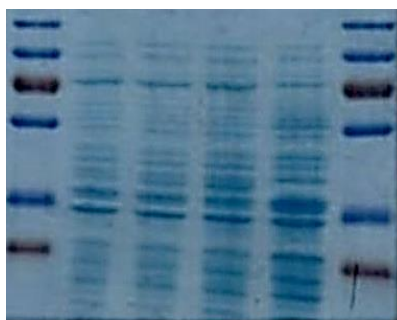


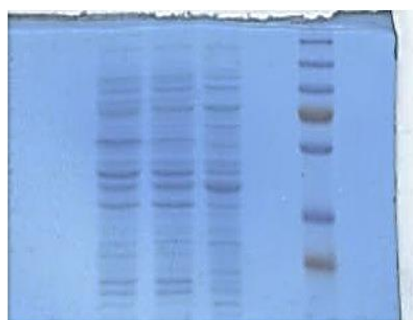
Figura 22 Elettroforesi dell'espressione di CLAN-A. I campioni da sinistra verso destra: standard proteici; cellule BL21 IPTG 0mM; cellule BL21 IPTG 0,25 mM; cellule BL21-pB01 IPTG 0 mM; cellule BL21-pB01 IPTG 0,05 mM; cellule BL21-pB01 IPTG 0,1 mM; cellule BL21-pB01 IPTG 0,25 mM.

L'espressione di CLAN-A è stata testata in diversi ceppi batterici come descritto nel **paragrafo 2.9.1**. Dagli esperimenti è emerso che nessuno dei ceppi batterici testati è in grado di esprimere correttamente CLAN-A. L'analisi dei gel di elettroforesi ha infatti messo in luce l'assenza di una evidente banda del Peso Molecolare corrispondente alla proteina di interesse. Un risultato di questo tipo può essere imputato a più fattori. In primo luogo CLAN-A è una proteina ad alto peso molecolare con una struttura complessa; è quindi molto probabile che per raggiungere il ripiegamento corretto siano richiesti numerosi passaggi e che la cellula batterica non sia in grado di effettuare o favorire tutti questi passaggi.

Questo può portare alla produzione di una proteina con un errato folding proteico che viene rapidamente degradata.



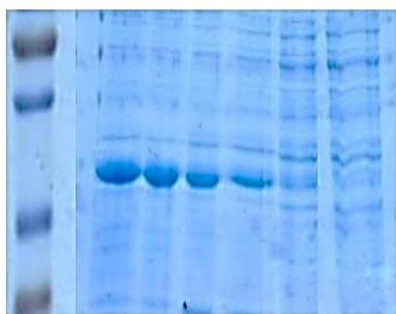
1) Espressione di CLAN-B



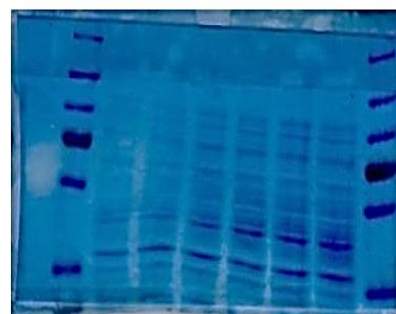
2) Purificazione CLAN-B metodo I



3) Purificazione CLAN-B metodo II



4) Purificazione CLAN-B metodo III



5) Espressione CLAN-A

Figura 23 Immagine riassuntiva dei risultati ottenuti negli esperimenti di espressione e purificazione.

4 Conclusioni e Prospettive Future

Le proteine CLAN sono un ristretto gruppo di proteine citosoliche recentemente scoperte, generate come varianti di splicing dallo stesso locus genomico di 41,3 Kbs sul cromosoma 2. Sono state individuate quattro isoforme di CLAN (CLAN-A, B, C, D) di cui le più abbondanti sono l'isoforma A e quella B (Damiano J.S., et al., 2001). Sebbene siano moltissime le evidenze del coinvolgimento di CLAN nei processi infiammatori e di morte cellulare (la proteina fa parte dell'infiaromosoma e interagisce con la caspasi 1), rimangono ancora molti punti da chiarire su queste proteine, sia dal punto di vista fisiologico che da quello biochimico-strutturale. Recentemente Tozzi e collaboratori hanno individuato con uno studio esplorativo di doppio ibrido in lievito le proteine CLAN-A e CLAN-B come possibili partner di interazioni con la cN-II (Tozzi M.G. et al., 2013, dati non ancora pubblicati). La 5'nucleotidasi citosolica II è un enzima che riveste grande importanza nel metabolismo cellulare: catalizzando la defosforilazione di ribo- e deossiribonucleosidi contribuisce a regolare la loro concentrazione intracellulare. La sua centralità è testimoniata dall'elevato grado di conservazione, dall'essere espressa in tutti i tessuti, e dal fatto che il suo silenziamento in cellule di astrocitoma induce apoptosi (Careddu M.G., et al., 2008). Tenendo conto di queste premesse, scopo di questo lavoro è stato testare la possibilità di esprimere e successivamente

purificare le suddette proteine. A seguito degli esperimenti condotti sono emersi risultati interessanti.

I primi passi sono stati mossi lavorando con la forma a più alto peso molecolare (CLAN-A). Non è però stato possibile ottenere l'espressione della proteina, probabilmente a causa dell'alto peso molecolare e della complessa struttura proteica. Strutturalmente CLAN-A e CLAN-B differiscono per l'assenza nell'isoforma B del dominio centrale NACHT. Perciò è stato possibile modificare il plasmide codificante per CLAN-A ottenendone uno codificante per CLAN-B. La procedura di modifica ha previsto l'amplificazione dei frammenti fiancheggianti il dominio NACHT che sono stati poi uniti a formare un unico frammento corrispondente alla sequenza codificante per CLAN-B. Il plasmide pB01-CLANA e il frammento precedentemente ottenuto sono stati digeriti con gli enzimi di restrizione Xba e Not I e messi a contatto per formare il plasmide richiesto. Il risultato è stato confermato sia digerendo il plasmide con gli stessi enzimi di restrizione, verificando poi la presenza di frammenti delle dimensioni previste, sia sequenziandolo. Il plasmide è stato usato per trasformare cellule di *Escherichia Coli Rosetta*; in queste cellule è stata indotta l'espressione della proteina usando IPTG come induttore specifico dell'espressione. Il passaggio successivo è stata la purificazione della proteina. Per farlo si è scelto di usare una resina Ni-NTA Agarosio contenente ioni Ni^{2+} che potesse legare la coda di istidine della proteina. Sono state testate tre metodiche di cui due operanti in condizioni native e una in condizioni denaturanti. Gli esperimenti condotti hanno evidenziato l'impossibilità di purificare la proteina in condizioni native; CLAN-B risultava infatti essere presente in

tutti i passaggi di purificazione quando era attesa solamente nel passaggio di eluizione. Gli esperimenti hanno però fornito un dato importante: poiché la principale causa della mancata purificazione è da imputarsi al ripiegamento proteico di CLAN-B che escluderebbe la coda di istidine da un ottimale contatto con l'ambiente esterno, è necessario usare un approccio che consenta l'esposizione della His-Tag. Per questo motivo la terza metodica di purificazione testata opera in condizioni denaturanti. Le condizioni denaturanti, ottenute aggiungendo all'estratto grezzo Cloruro di Guanidinio e usando buffer contenenti Urea 8M, hanno permesso l'esposizione della coda di istidine che ha potuto legarsi alla resina. L'eluizione è stata ottenuta variando il grado di ionizzazione dei residui di istidina usando buffer ad acidità crescente che hanno consentito il distacco della proteina dalla resina quando voluto. Con questo protocollo è stato possibile purificare la proteina. Dai risultati è emerso chiaramente che in queste condizioni la proteina può interagire in maniera ottimale con la resina. In definitiva il lavoro di questa tesi ha dimostrato che è possibile esprimere CLAN-B in *E.Coli* ed è stato messo a punto un protocollo per la purificazione della proteina in questione; dai risultati della purificazione è emerso che, nelle condizioni sperimentate, CLAN-B esiste sia in forma monomerica che in quella multimerica.

Poiché questo studio ha l'ambizione di essere il punto di partenza per ulteriori studi è d'obbligo discutere anche delle prospettive future. Il risultato più importante di questa tesi è stato riuscire ad esprimere e successivamente trovare il modo di purificare CLAN-B, una serie di esperimenti mai condotti prima per questa proteina. CLAN-B, a differenza

dell'isoforma A, è espressa in tutti i tessuti umani ma il suo ruolo fisiologico non è mai stato studiato nel dettaglio; la maggior parte dei dati e delle informazioni disponibili in letteratura riguarda infatti CLAN-A. Avere a disposizione un metodo per esprimere e purificare CLAN-B potrà essere utile per iniziare a studiare anche questa isoforma di CLAN, ad esempio con studi strutturali-cristallografici. Inoltre CLAN-B è stato identificato come possibile partner di interazioni della 5' nucleotidasi citosolica II; in questo contesto la sua purificazione può rappresentare un ottimo punto di partenza per dimostrare, almeno *in vitro*, l'interazione tra le due proteine, consentendo di fare luce sulle ultime lacune rimaste nella comprensione dell'importante ruolo fisiologico della 5' nucleotidasi citosolica II.

5 Ringraziamenti

Voglio ringraziare tutti coloro che mi hanno accompagnato e supportato in questo percorso, in particolare la Professoressa Maria Grazia Tozzi, la Dottoressa Rossana Pesi, il Dottor Federico Cividini e il Dottor Simone Allegrini che in questi mesi mi hanno seguito con dedizione, pazienza, professionalità e competenze esemplari.

6 Riferimenti

- Abdelaziz D.H., Amr K., & Amer A.O.** (2010). Nlrc4/Ipaf/CLAN/CARD12: more than a flagellin sensor. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **42**, 789–791.
- Allegrini S., Filoni D.N., Galli A., Collavoli A., Pesi R., Camici M., & Tozzi M.G.** (2013). Expression of bovine cytosolic 5' nucleotidase in Yeats: nucleotide pools disturbance and Its Consequences on Growth and Homologous Recombination. *PLoS ONE* **8(5)**, e63914.
- Allegrini S., Pesi R., Tozzi M.G., Fiolo C., Johnson B., & Eriksson S.** (1997). Bovine cytosolic IMP/GMP-specific 5'-nucleotidase: cloning and expression of active enzyme in Escherichia coli. *Biochemical Journal* **328**, 483-487.
- Allegrini S., Pesi R., Tozzi M.G., Ipata P.L., & Camici M.** (1993). Cytosolic 5'-nucleotidase/nucleoside phosphotransferase: a single assay for a bifunctional enzyme. *Journal of Biochemical and Biophysical methods* **27**, 293-299.
- Allegrini S., Scaloni A., Careddu M.G., Cuccu G., D'Ambrosio C., Pesi R., . . . Tozzi M.G.** (2004). Mechanistic studies on bovine cytosolic 5'-nucleotidase II, an enzyme belonging to the HAD superfamily. *European Journal of Biochemistry* **271**, 4881-4891.
- Amer A., Franchi L., Kannegati T.D., Body-Malapel M., Ozoren N., Brady G., ... Nunez G.** (2006). Regulation of Legionella phagosome

maturation and infection through flagellin and host Ipaf. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 35217-35223.

Amici A., Ciccioli K., Naponelli V., Raffaelli N., & Magni G. (2005) Evidence for essential catalytic determinants for human erythrocyte pyrimidine 5'-nucleotidase. *Cellular and Molecular Life Science* **62**, 1613-1620.

Aravind L., Galperin M.Y, & Koonin E. (1998). The catalytic domain of the P-type ATPase has the haloacid dehalogenase fold. *TRENDS in Biochemical Sciences* **23**, 127-129.

Arend W.P., Palmer G., & Gabay C. (2008). IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines. *Immunology Review* **223**, 20–38.

Baiocchi C., Pesì R., Camici M., Itoh R., & Tozzi M.G. (1996). Mechanisms of reaction catalyzed by cytosolic 5'-nucleotidase/phosphotransferase: formation of a phosphorylated intermediate. *Biochemical Journal* **317**, 797-801.

Banditelli S., Baiocchi C., Pesì R., Allegrini S., Turriani M., Ipata P.L., . . . Tozzi M.G. (1996). The phosphotransferase activity of cytosolic 5'-nucleotidase; a purine analog phosphorylating enzyme. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **28**, 711-720.

Barsotti C., Pesì R., Felice F., & Ipata P.L. (2003). The purine nucleoside cycle in cell-free extracts of rat brain: evidence for the occurrence of an inosine and a guanosine cycle with distinct metabolic rules. *Cellular and Molecular Life Science* **60**, 786-793.

Barsotti C., Pesì R., Giannecchini M., & Ipata P.L. (2005). Evidence for the Involvement of Cytosolic 5'-Nucleotidase (cN-II) in the Synthesis of Guanine Nucleotides from Xanthosine. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 13465-13469.

Berman P.A., Black D.A., Human L., & Harley E.H. (1988). Oxypurine cycle in human erythrocytes regulated by pH, inorganic phosphate, and oxygen. *Journal of Clinical Investigation* **82**, 980-986.

Bitto E., Bingman C. A., Wesenberg G. E., McCoy J. G., & Phillips G. N. Jr. (2006) Structure of Pyrimidine 5'-nucleotidase type 1. Insight into mechanism of action and inhibition during lead poisoning. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 20521-20529.

Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.

Camici M., Micheli V., Ipata P.L., & Tozzi M.G. (2010). Pediatric neurological syndrome and inborn errors of purine metabolism. *Neurochemistry International* **56**, 367-378.

Careddu M.G., Allegrini S., Pesì R., Camici M., Garcia-Gil M., & Tozzi M.G. (2008). Knockdown of cytosolic 5'- nucleotidase II (cN-II) reveals that its activity is essential for survival in astrocytoma cells. *Biochimica et Biophysica Acta* **1783**, 1529–1535.

Collet J.F., Stroobant V, Pirard M., & Delpierre G. (1998). A new class of phosphotransferases phosphorylated on an aspartate residue in an amino-

terminal DXDX(T/V) motif. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 14107-14112.

Da Silva Correia J., Miranda Y., Leonard N., & Ulevitch R. (2007). SGT1 is essential for NOD1 activation. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **104**, 6764-6769.

Damiano J.S., Newmann R.M., & Reed J.C. (2004b). Multiple Roles of CLAN (Caspase-Associated Recruitment Domain, Leucine-Rich Repeat, and NAIP CIIA HET-E, and TP1-Containing Protein) in the Mammalian Innate Immune Response. *Journal of Immunology* **173**, 6338-6345.

Damiano J.S., Oliveira V., Welsh K., & Reed J.C. (2004). Heterotopic interaction among NACHT domains: implication for regulation of innate immune response. *Biochemical Journal* **381**, 213-219.

Damiano J.S., Stehlik C., Pio F., Godzik A., & Reed J.C. (2001). CLAN, a Novel Human CED-4-like Gene. *Genomics* **75**, 1-3.

Dowds T.A. (2003). Regulation of cryopyrin/Pypaf1 signaling by pyrin, the familial Mediterranean fever gene product. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **302**, 575-580.

Dumontet C., Fabianowska-Majewska K., Mantincic D., Callet Bauchu E., Tigaud I., Gandhi V., Lepoivre M., Peters G. J., Rolland M. O., Wyczechowska D., Fang X., Gazzo S., Voorn D. A., Vanier-Vironery A., & MacKey J. (1999). Common resistance mechanism to deoxynucleoside analogues in variants of the human erythroleukaemic line K562. *British Journal of Haematology* **106**, 78-85.

Fersht A. (1989). In *Enzyme Structure and Mechanisms*, 2nd edn (p. 118-119). San Francisco: W. H. Freeman and Co.

Fesik S.W. (2000). Insights into programmed cell death through structural biology. *Cell* **103**, 273-282.

Franchi L., & Nùñez G. (2012). Orchestrating Inflammasomes. *Science* **337**, 1299-1301.

Franchi L., Amer A., Body-Malapel M., Kannegati T., Ozoren N., Jagirdar R., . . . Coyle A. (2006). Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1 β in Salmonella-infected macrophages. *Nature Immunology* **7**, 576–582.

Galmarini C.M., Graham K., Thomas X., Calvo F., Rousselot P., El Jafaari A., . . . Dumontet C. (2001). Expression of high Km 5'-nucleotidase in leukemic blasts is an independent prognostic factor in adults with acute myeloid leukaemia. *Blood* **98**, 1922-1926.

Galmarini C.M., Thomas X., Graham K., El Jafaari G., Cros E., Jordheim L., . . . Dumontet C. (2003). Deoxycytidine kinase and cN-II nucleotidase expression in blast cells predict survival in acute myeloid leukaemia patients treated with cytarabine. *British Journal of Haematology* **122**, 53-60.

Gurcel L., Abrami L., Girardin S., Tschopp J., & Van der Goot F.G. (2006). Caspase-1 activation of lipid metabolic pathways in response to bacterial pore-forming toxins promotes cell survival. *Cell* **126**, 1135–1145.

- Hofmann K., Bucher P., & Tschopp J.** (1997). The CARD domain: a new apoptotic signalling motif. *Trends in Biochemical Science* **22**, 155-156.
- Hueck C.J.** (1998). Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **62**, 379-433.
- Inohara N., Koseki T., Lin J., Del Peso L., Lucas P.C., Chen F.F., . . . Nunez G.** (2000). An induced proximity model for NF- κ B activation in the Nod1/RICK and RIP signaling pathways. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 27823–27831.
- Ipata P.L., & Tozzi M.G.** (2006). Recent advances in structure and function of cytosolic IMP-GMP specific 5'-nucleotidase II (cN-II). *Purinergic Signalling* **2**, 669-675.
- Itho R.** (1981). Purification and some properties of cytosol 5'-nucleotidase from rat liver. *Biochimica et Biophysica Acta* **657**, 402–410.
- Itho R.** (1993). Mini review. IMP-GMP 5'-nucleotidase. *Comparative Biochemistry and Physiology* **278**, 46195–46198.
- Itoh R.** (1993). IMP-GMP 5'-nucleotidase. *Comparative Biochemistry and Physiology* **105**, 13-19.
- Itoh R., & Tsushima K.** (1972). Changes in 5'-nucleotidase activity in chicken liver during development and dietary adaptation. *Biochimica et Biophysica Acta* **273**, 229-235.

- Itoh R., & Tsushima K.** (1974). Comparison of adaptation to diet of enzymes involved in uric acid production from IMP in chickens and rats. *Journal of Biochemistry* **74**, 715-721.
- Itoh R., & Yamanada K.** (1991). Determination of cytoplasmic 5'-nucleotidase which preferentially hydrolyses 6-hydroxypurine nucleotides in pig, rat and human tissues by immunotitration. *International Journal of Biochemistry* **23**, 461-465.
- Itoh R., Saint-Marc C., Chaignepain S., Katahira R., Schmitter J.M.** (2003) The yeast ISN1 (YOR155c) gene encodes a new type of IMP-specific 5'-nucleotidase. *BMC Biochemistry* **4**, 4.
- Johnson M.A., & Fridland A.** (1989). Phosphorylation of 2',3'-dideoxyinosine by cytosolic 5'-Nucleotidase of human lymphoid cells. *Molecular Pharmacology* **36**, 291-295.
- Joshi J.G., & Handler P.** (1969). Purification and Properties of Phosphoglucomutase from Fleischmann's Yeast. *Journal of Biological Chemistry* **244**, 3343-3351.
- Karin L.H., & Pease L.R.** (2007). Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension. *Nature Protocols* **2**, 924-933.
- Keller M, Ruegg A., Werner S., & Beer H.D.** (2008). Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion. *Cell* **132**, 818–831.
- Keller P.M., McKee S.A., & Fyfe J.A.** (1985). Cytoplasmic 5'-nucleotidase catalyses acyclovir phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* **260**, 8664-8667.

- Kobe B., & Deisenhofer J.** (1999). Proteins and leucine-rich domain repeats. *Current Opinion in Structural Biology* **5**, 409-416.
- Kofoed E.M., & Vance R.E.** (2011). Innate immune recognition of bacterial ligands by NAIPs determines inflammasome specificity. *Nature* **477**, 592-595.
- Koonin E.V., & Aravandin L.** (2000). The NACHT family—A new group of predicted NTPases implicated in apoptosis and MHC Transcription activation. *Trends in Biochemical Science* **25**, 223-224.
- Kufer T.A., & Sansonetti P.J.** (2011). NLR functions beyond pathogen recognition. *Nature Immunology* **12**, 121–128.
- Lahiri S.D., Z. G.-M., Lahiri S.D., Zhang G., Dai J., Dunaway-Mariano D., & Allen K.N.** (2004). Analysis of the substrate specificity loop of the HAD superfamily cap domain. *Biochemistry*, **43**, 2812-2820.
- Le Hir M.** (1991). A soluble 5'-nucleotidase in rat kidney. Stimulation by decavanadate. *Biochemistry Journal* **273**, 795–798.
- Liu J.Q., Kurihara T., Miyagi M., Esaki N., & Soda K.** (1995). Reaction mechanism of L-2-haloacid dehalogenase of *Pseudomonas* sp.YL. Identification of Asp10 as the active site nucleophile by ¹⁸O incorporation experiments. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 18309–18312.
- Mariathsan S., Newton K., Monack D.M., Vucic D., French D.M., Lee W.P., . . . Dixit V.M.** (2004). Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature* **430**, 213–218.

Marques A.F.P., Teixeira N.A., Gambaretto C., Sillero A., & Sillero M.A.G. (1998). IMP-GMP 5'-nucleotidase from rat brain: activation by polyphosphates. *Journal of Neurochemistry* **71**, 1241–1250.

Martinon F., Burns K., & Tschopp J. (2002) The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Molecular Cell* **10**, 417–426.

Martinon F., & Tschopp J. (2004). Inflammatory caspases: linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases. *Cell* **117**, 561–574.

Mayor A., Martinon F., De Smedt T., Pétrilli V., & Tschopp J. (2007). A crucial function of SGT1 and Hsp90 in inflammasome activity links mammalian and plant innate immune response. *Nature Immunology* **8**, 497-503.

Miao E.A. & Warren S.E. (2010). Innate immune detection of bacterial virulence factors via the NLRC4 inflammasome. *Journal of Clinical Immunology* **30**, 502-506.

Miao E.A., Alpuche-Aranda C.M., Dors M., Clark A.E., Bader M.W., Miller S.I., & Aderem A. (2006). Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1beta via Ipaf. *Nature Immunology* **7**, 569-575.

Miao E.A., Ernst R.K., Dors M., Mao D.P., & Aderem A. (2008) *Pseudomonas aeruginosa* activates caspase 1 through Ipaf. *Proceeding of the National Academy of Science U S A* **105**, 2562–2567.

Miao E.A., Mao DP, Yudkovsky N., Bonneau R., Lorang C.G., Warren S.E., Leaf I.A., & Aderem A. (2010). Innate immune detection of the type III secretion apparatus through the NLRC4 inflammasome. *Proceeding of National Academy of Science U S A* **107**, 3076–3080.

Mitra A.K., Crews K., Pounds S., Cao X., & Feldberg T. (2011). Genetic variants in NT5C2 are associated with its expression and cytarabine sensitivity in HapMap cell lines and in AML patients. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **339**, 9–23.

Morais M.C, Zhang W., Baker A., Zhang G., & Dunaway-Mariano D. (2000). The crystal structure of *Bacillus cereus* Phosphonoacetaldehyde Hydrolase: insight into catalysis of phosphorus bond cleavage and catalytic diversification within the HAD enzyme superfamily. *Biochemistry* **39**, 10385-10396.

Pelled D., Sperling O., & Zoref-Shani E. (1999). Abnormal purine and pyrimidine nucleotide content in primary astroglia cultures from hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase-deficient transgenic mice. *Journal of Neurochemistry* **72**, 1139-1145.

Pesi R., Allegrini S., Careddu M.G., Filoni D.N., Camici M., & Tozzi M.G. (2010). Active and regulatory sites of cytosolic 5'-nucleotidase. *FEBS Journal* **277**, 4863–4872.

Pesi R., Baiocchi C., Allegrini S., Moretti E., Sgarella F., Camici M., & Tozzi M.G. (1998). Identification, separation and characterization of two forms of cytosolic 5' nucleotidase/nucleoside phosphotransferase in calf thymus. *Biological Chemistry* **379**, 699-704.

Pesi R., Baiocchi C., Tozzi M.G., & Camici M. (1996). Synergistic action of ADP and 2,3-bisphosphoglycerate on the modulation of cytosolic 5'-nucleotidase. *Biochimica et Biophysica Acta* **1294**, 191-194.

Pesi R., Micheli V., Jacomelli G., Peruzzi L., Camici M., Garcia-Gil M., . . . Tozzi M.G. (2000). Cytosolic 5'-nucleotidase hyperactivity in erythrocytes of Lesh-Nyhan syndrome patients. *Neuroreport Clinical Neuroscience* **11**, 1827-1831.

Pesi R., Turriani M., Allegrini S., Scolozzi C., Camici M., Ipata P.L., & Tozzi M.G. (1994). The bifunctional cytosolic 5'-nucleotidase: regulation of the phosphotransferase and nucleotidase activities. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **312**, 75-80.

Pétrilli V., Papin S., Dostert C., Mayor A., Martinon F., & Tschopp J. (2007). Activation of the NALP3 inflammosome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death & Differentiation* **14**, 1583-1589.

Pinto R.M., Canales J., Faraldo A., Sillero A., & Sillero M.A.G. (1987). Cytosolic 5'-nucleotidase from *Artemia* embryos. Purification and properties. *Comparative Biochemistry and Physiology* **86B**, 49-53.

Poyet J.L., Srinivasula S.M., Tnani M., Razmara M., Fernandes-Alnemri T., & Alnemri E.S. (2001). Identification of Ipaf, a human caspase-1-activating protein related to Apaf-1. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 28309–28313.

Qu Y., Shahram M., Izrael-Tomasevic A., Newton K., Gilmour L.L., Lamkanfi M., Louie S. ... & Dixit V.M. (2012). Phosphorylation of NLRC4 is critical for inflammasome activation. *Nature* **10**, 1038.

Quiagen (2003). The Qiaexpressionist. *Fifth Edition*.

Rampazzo C., Gazziola C., Ferraro P., Gallinaro L., Johansson M., Reichard P., & Bianchi V. (1999). Human high-Km 5'-nucleotidase. Effect of overexpression of the cloned cDNA in cultured human cells. *European Journal of Biochemistry* **261**, 689-697.

Ridder I.S., & Dijkstra B.W. (1999). Identification of the Mg²⁺ -binding site in the P-type ATPase and phosphatase members of the HAD (haloacid dehalogenase) superfamily by structural similarity to the response regulator protein Che Y. *Biochemical Journal* **339**, 223-226.

Rinaldo-Matthis A., Rampazzo C., Reichard P., Bianchi V. & Nordlund P. (2002) Crystal structures of a human mitochondrial deoxyribonucleotidase. *Nature Structural Biology* **9**, 779-787.

Rosenstiel P., Till A., & Schreiber S. (2007). NOD-Like Receptors and human diseases. *Microbes and Infection* **9**, 648-657.

Sadasivam S., Gupta S., Radha V., Batta K., Kundu T., & Swarup G. (2005). Caspase-1 activator Ipaf is a p53-inducible gene involved in apoptosis. *Oncogene* **24**, 627–636.

Sala-Newby G.B., Skladanowsky A.C. & Newby A.C. (1999). The mechanism of adenosine formation in cells: cloning of cytosolic 5'-nucleotidase I. *The Journal of Biological Chemistry* **274**, 17789-17793.

- Schirmer M., Stegmann A.P.A., Geisen F., & Konwalinka G.** (1998). Lack of cross-resistance with gemcitabine and cytarabine in cladribine-resistant HL60 cells with elevated 5'-nucleotidase activity. *Experimental Hematology* **26**, 1223-1228.
- Shin D.H., Roberts A., Jancarik J., Yokota H., Kim R., Wemmer D.E., & Kim S.H.** (2003). Crystal structure of a phosphatase with a unique substrate binding domain from *Thermotoga maritima*. *Protein Science* **12**, 1464-1472.
- Sidi Y., & Mitchell B.S.** (1985). Z-nucleotide accumulation in erythrocytes from Lesch-Nyhan patients. *Journal of Clinical Investigation* **76**, 2416–2419.
- Sidwell R.W., J.H. Huffman, Khare G.P., Allene L.B., Witkowski J.T., & Robins R.K.** (1972). Broad-spectrum antiviral activity of virazole: 1-beta-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide. *Science* **177**, 705–706.
- Spycala J., Chen V., Oka J., & Mitchell B.S.** (1999). ATP and phosphate reciprocally affect subunit association of human recombinant High Km 5'-nucleotidase. *European Journal of Biochemistry* **259**, 851-858.
- Sun Y.H., Rolan H.G., & Tsolis R.M.** (2007). Injection of flagellin into the host cell cytosol by *Salmonella Enterica* serotype Typhimurium. *International Journal of Biological Chemistry* **282**, 33897-33901.
- Sutterwala F.S., & Flavell R.A.** (2009). NLRC4/IPAF: a CARD carrying member of the NLR family. *Clinical Immunology* **130**(1), 2-6.

- Ting J.P., Kastner D.L., & Hoffman H.M.** (2006). CATERPILLERs, pyrin and hereditary immunological disorders. *Nature Reviews Immunology* **6**, 183-195.
- Tozzi M.G., Camici M., Pesì R., Allegrini S., Sgarella F., & Ipata P.L.** (1991). Nucleoside phosphotransferase activity of human colon carcinoma cytosolic 5'-nucleotidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **291**, 212-217.
- Van Moltke J., Ayres J.S., Kofoed E.M., Chavarria-Smith J., & Vance R.E.** (2013). Recognition of bacteria by inflammasomes. *Annual Review of Immunology* **31**, 73-106.
- Walev I., Reske K., Palmer M., Valeva A., & Bhakdi S.** (1995). Potassium-inhibited processing of IL-1 β in human monocytes *The EMBO Journal* **14**, 1607-1614.
- Wallden K., Stenmark P., Nyman T., Flodin S., Graslund S., Loppnau P., . . . Nordlund P.** (2007). Crystal Structure of Human Cytosolic 5'-Nucleotidase II: Insights into allosteric regulation and substrate recognition. *The Journal of Biological Chemistry* **282**, 17828-17836.
- Wang W., Kim R., Jankarik J., Yokota H., & Kim S.H.** (2001). Crystal structure of phosphoserine phosphatase from *Methanococcus jannaschii*, a hyper thermophile, at 1.8 Å resolution. *Structure* **9**, 65-71.
- Warren S.E., Mao D.P., Rodríguez A.E., Miao E.A., & Aderem A.** (2008) Multiple Nod-like receptors activate caspase 1 during *Listeria monocytogenes* infection. *Journal of Immunology* **180**, 7558–7564.

Worku Y., & Newby A.C. (1982). Nucleoside exchange catalysed by the cytoplasmic 5'-nucleotidase. *Biochemical Journal* **205**, 503-510.

Wu J.Z., Larson G., Walker H., Shim J.S., & Hong Z. (2005). Phosphorylation of ribavirin and viramidine by adenosine kinase and cytosolic 5'-nucleotidase II: implications for ribavirin metabolism in erythrocytes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **49**, 2164-2171.

Yamanuchi T., Negoro E., Kishi S., Takagi K., Yoshida A., Urasaki Y., . . . Ueda T. (2009). Intracellular cytarabine triphosphate production correlates to deoxycytidine kinase/cytosolic 5'-nucleotidase II expression ratio in primary acute myeloid leukemia cells. *Biochemical Pharmacology*, **77**, 1780–1786.

Yang J., Zhao Y., Shi J., & Shao F. (2013). Human NAIP and mouse NAIP1 recognize bacterial type III secretion needle protein for inflammasome activation. *Proceeding of National Academy of Science USA* **110**, 14408-14413.

Zhao Y., Yang J., Shi J., Gong Y.H., Xu H., Liu L., & Shao F. (2011). The NLRC4 inflammasome receptors for bacterial flagellin and type III secretion apparatus. *Nature* **477**, 596-600.